

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
des Instituts für Pharmakologie
(Leiter und Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Mladen V. Tzvetkov)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Untersuchung der Affinität von Tigecyclin zu hepatischen Aufnahme- und Effluxtransportern

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2018

vorgelegt von:
Ulrike Rust
geb. am: 02.09.1990
in: Spremberg

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur
1. Gutachter:	Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Bernhard H. Rauch
Ort, Raum:	Greifswald, C_DAT, Felix-Hausdorf-Str. 3, SR1
Tag der Disputation:	23. November 2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
2. Aufgabenstellung.....	9
3. Material und Methoden.....	10
3.1 Tigecyclin.....	10
3.2 Verwendete Zelllinien.....	11
3.3 Zellkultivierung.....	11
3.4 Proteinbestimmung.....	14
3.5 Zellviabilität.....	15
3.6 Untersuchung des Einflusses von Tigecyclin auf verschie- dene Aufnahme- und Effluxtransporter.....	17
3.6.1 Versuche zu Aufnahmetransportern.....	17
3.6.1.1 Allgemeiner Versuchsablauf für Aufnahme- und Kompetitionsassays.....	17
3.6.1.2 Kompetitionsassays.....	19
3.6.1.3 Aufnahmeassays.....	20
3.6.2 Vesikelassays der Effluxtransporter	21
3.7 Analytik mittels LC-MS/MS.....	23
3.8 Statistische Auswertung.....	24
4. Ergebnisse.....	25
4.1 Funktionalität der Zellen.....	25
4.2 Überprüfung der Stabilität von Tigecyclin.....	26
4.3 Viabilitätsassay.....	26
4.4 Kompetitionsassays der Aufnahmetransporter.....	28
4.5 Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahme.....	29
4.6 Vesikelassays der Effluxtransporter.....	30
5. Diskussion.....	32
6. Zusammenfassung.....	41
7. Literaturverzeichnis.....	43

8.	Anhang.....	51
8.1	Zellen und Vesikel.....	51
8.2	Laborgeräte, Software und Verbrauchsmaterialien.....	51
8.2.1	Laborgeräte.....	51
8.2.2	Software.....	53
8.2.3	Verbrauchsmaterialien.....	54
8.3	Chemikalien, Kits, Medien und Puffer.....	55
8.3.1	Chemikalien und Kits.....	55
8.3.2	Medien, Puffer und weitere Lösungen	57
8.4	Hepatische Aufnahme- und Effluxtransporter, die möglicher- weise Tigecyclin transportieren.....	60
8.5	Zusammensetzungen der Versuchslösungen und Pipettier- schemata.....	62
8.5.1	Stammlösung Tigecyclin.....	62
8.5.2	Transportversuche zur Überprüfung der Funktion von Transportproteinen.....	62
8.5.3	Kompetitionsassays der Aufnahmetransporter.....	64
8.5.4	Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeassays...	68
8.5.5	Vesikelassays der Effluxtransporter.....	69
8.6	Ergebnisse.....	70
8.6.1	Zellviabilität.....	70
8.7	Eidesstattliche Erklärung.....	73
8.8	Danksagung.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Strukturformeln von Tetracyclin, Minocyclin und Tigecyclin.	3
Abb. 1.2:	Strukturmodell eines OATP1B1-Transporters mit zwölf Transmembrandomänen.	6
Abb. 1.3:	Modell des „rocker-switch“ Mechanismus am Beispiel der bakteriellen Lactose Permease.	6
Abb. 1.4:	Darstellung eines Hepatozyten mit humanen Aufnahme-transportern (OATP- und NTCP-Transporter) und ATP-abhängigen Effluxpumpen (MRP-Transporter).	8
Abb. 3.1:	Lichtmikroskopische Aufnahme einer HEK-OATP2B1 Zellkultur.	11
Abb. 3.2:	Strukturformel Poly-D-Lysin.	13
Abb. 3.3:	Bildung eines violetten Chelatkomplexes aus zwei BCA-Molekülen und einwertigem Kupfer zur quantitativen Proteinbestimmung.	15
Abb. 3.4:	Reduktion von Resazurin zu Resorufin beim Zellviabilitätsassay <i>PrestoBlue</i> [®]	15
Abb. 3.5:	Prinzip des Kompetitionsassays: Transporter-vermittelte Aufnahme von Substrat in Abwesenheit oder Anwesenheit eines kompetitiven Transportinhibitors.	19
Abb. 3.6:	Prinzip des Substrattransportes in isolierten <i>inside-out</i> -Lipovesikeln aus Sf-9-Zellmembranen von Ovarialzellen einer Nachtfalterart.	22
Abb. 4.1:	Funktionalitätsprüfung der Transporter-transfizierten HEK293-Zellen mit bekannten Standardsubstraten und Inhibitoren. ...	25
Abb 4.2:	Stabilität von Tigecyclin in Wasser, 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl) und Inkubationspuffer (IP) nach 48-stündiger Lagerung bei 4 °C bzw. -80 °C im Vergleich zu frisch angesetzten Proben.	26
Abb. 4.3:	Zellviabilität von HEK293-Zellen im <i>PrestoBlue</i> [®] Toxizitätsassay nach 120-minütiger Inkubation mit 100 µmol/l Tigecyclin.	27
Abb. 4.4:	Kompetition der Aufnahme des Standardsubstrates BSP	

	mit Tigecyclin in OATP1B3- (blau) und -2B1- (grün) exprimierenden HEK293-Zellen nach 5-minütiger Inkubation. Die kleinen Abbildungen stellen die Bruttoaufnahmen in den Transporterprotein-transfizierten und den Vektor- tranzfizierten Kontrollzellen (grau) dar.	28
Abb. 4.5:	Kompetition der Aufnahme von Standardsubstraten mit Tigecyclin in OATP1B1- und NTCP-exprimierenden HEK293- Zellen nach 5-minütiger Inkubation.	29
Abb. 4.6:	Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeversuche in Transporter-transfizierten HEK293-Zellen mit 10 µmol/l bzw. 100 µmol/l Tigecyclin und einer 5- bzw. 20-minütigen Inkubation.	30
Abb. 4.7:	Kompetitionsassay mit Tigecyclin in MRP2- und MRP3- Vesikeln.	31
Abb. 8.1:	Plattenbelegung für die Transportversuche zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine.	63
Abb. 8.2:	Ansatz der Verdünnungsreihe für den Kompetitionsassay an HEK-OATP1B3 und -2B1 Zellen.	64
Abb. 8.3:	Plattenbelegung mit verschiedenen Konzentrationen von Tigecyclin beim Kompetitionsassay an HEK-OATP1B3 und -2B1 Zellen.	66
Abb. 8.4:	Ansatz der Verdünnungsreihe für den Kompetitionsassay an HEK-OATP1B1 und -NTCP Zellen.	66
Abb. 8.5:	Plattenbelegung mit verschiedenen Konzentrationen von Tigecyclin beim Kompetitionsassay an HEK-OATP1B1 und -NTCP Zellen.	67
Abb. 8.6:	Plattenbelegung des zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahmeassays mit 10 µmol/l bzw. 100 µmol/l Tigecyclin und einer 5- bzw. 20-minütigen Inkubation.	68
Abb. 8.7:	Ansätze der Versuchslösungen für die zeit- und konzentra- tionsabhängigen Aufnahmeassays mit Tigecyclin.	69
Abb. 8.8:	Versuchslösungen des Kompetitionsassays mit TGE in MRP2- und MRP3-Vesikeln.	69
Abb. 8.9:	Versuchslösungen des Aufnahmeassays mit TGE in MRP2- und MRP3-Vesikeln.	70

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Wirkspektrum und Resistenzen vom Glycylcyclin Tigecyclin.	3
Tab. 3.1:	Informationen zur zu untersuchenden Substanz Tigecyclin.	10
Tab. 3.2:	Menge an verwendetem Medium pro Zellkulturgefäß.	12
Tab. 3.3:	Verwendetes Zellkulturmedium mit Zusätzen für HEK-Zellen. .	12
Tab. 3.4:	Stabil exprimierende Zelllinien und verwendete Antibiotika.	13
Tab. 3.5	Menge an verwendetem Poly-D-Lysin pro Zellkulturgefäß.	14
Tab. 3.6:	Verwendete Standardsubstrate und Standardinhibitoren zur Überprüfung der Zellfunktion.	20
Tab. 4.1:	Zellviabilität von HEK293-Zellen im <i>PrestoBlue</i> ® Toxizitäts- assay nach 120-minütiger Inkubation mit 100 µmol/l Tigecyclin.	27
Tab. 8.1:	Substrate und Inhibitoren für die hepatischen Aufnahme- transporter OATP1B1, -1B3, -2B1 und NTCP sowie die ABC-Transporter MRP2 und MRP3.	60
Tab. 8.2:	Ansätze für die Transportversuche zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine.	62
Tab. 8.3:	Ansätze für die Inhibitorkontrollen der Transportversuche zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine.	63
Tab. 8.4:	Mit <i>PrestoBlue</i> ® untersuchte Zellviabilität bei Zugaben von 0 µmol/l, 10 µmol/l und 100 µmol/l Tigecyclin und einer Inkuba- tionszeit von 0, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min.	70

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
[³ H]	Tritium
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AML	akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Aqua dest.	Aqua destillata
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit</i> (beliebige Einheit)
AUC	<i>area under the curve</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSEP	<i>bile salt exporting pump</i>
BSP	Bromsulphothalein
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ci	Curie
CK	Creatinkinase
C _{max}	Maximalkonzentration
CYP	Cytochrom P450
D.	Deutschland
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-17β-Gln	Estradiol-17-β-Glucuronid

E ₁ S	Estron-3-Sulfat
ESBL	<i>Extended-Spectrum-Betalaktamase</i>
et al.	et alii/ et aliae
evtl.	eventuell
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm bzw. Erdanziehungskraft ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
G418	Aminoglykosidantibiotikum Neomycin
ggfs.	gegebenenfalls
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i>
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HNF1 α	<i>hepatocyte nuclear factor 1α</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hOAT	<i>human organic anion transporter</i>
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration, zu Deutsch: mittlere inhibitorische Konzentration
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IP	Inkubationspuffer
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
K _m	Michaelis-Menten-Konstante bzw. Transporter-Substrat-Affinität
l	Liter
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
Lg	Logarithmus zur Basis 10
MEM	<i>minimum essential medium</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRP	<i>multidrug resistance associated protein</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Stoffmenge

n	Anzahl der Versuche
NaCl	Kochsalz
NADPH/ NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte/ oxidierte Form)
nm	Nanometer
NTCP	<i>sodium taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OATP	<i>organic anion-transporting polypeptide</i>
P _i	Phosphatrest
PBS	phosphate buffered saline
PDL	Poly-D-Lysin
P-gp	P-Glykoprotein
pK _s	Maß für die Stärke einer Säure
pmol	picomol
PT	Prothrombinzeit (Quick-Wert)
p-Wert	Signifikanzwert
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s.	siehe
SLC	<i>solute carrier</i>
SLCO	<i>solute carrier for organic anions</i>
SOP	<i>standard operating procedure</i>
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
TA	Taurocholat
Tab.	Tabelle
TGE	Tigecyclin
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TS	Tris-Sucrose
V _D	Verteilungsvolumen
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit bzw. maximale Transportkapazität
vs.	versus
VRE	Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Antibiotika sind Substanzen, die durch ihre bakteriostatische oder bakterizide Wirkung das Wachstum von Mikroorganismen hemmen können oder diese abtöten. Aufgrund dieser Eigenschaften kommen sie vielfältig zur Behandlung von diversen Infektionskrankheiten zum Einsatz. Zu den wohl bekanntesten antibiotisch wirksamen Substanzen zählen die Penicilline, die nach ihrer Entdeckung durch Alexander Flemming im Jahr 1928 maßgebliche Bedeutung in der Medizin erlangten [37]. Die Einsatzmöglichkeiten von Antibiotika in der praktischen Anwendung sind jedoch zum Teil deutlich begrenzt. Als Hauptproblem wird die steigende Resistenzentwicklung von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika gesehen. Zu einem dieser Mechanismen gehört die Spaltung des β -Lactam-Ringes durch das bakterielle Enzym β -Lactamase. Das führt zu Unwirksamkeit von β -Lactam-Antibiotika wie z.B. Penicillin. Um eine pathologische Ausbreitung auch von resistenten Mikroorganismen zu verhindern, ist die weiterführende Entwicklung neuer antimikrobieller Pharmaka notwendig. Zu den Reserveantibiotika, die unter anderem eine Wirkung gegen multiresistente Keime zeigen, gehört Tigecyclin [39].

Tigecyclin ist ein bakteriostatisch wirksames Breitspektrumantibiotikum aus der Gruppe der Glycylcycline, das 2006 in den USA und 2007 in Deutschland seine Zulassung zur parenteralen Gabe bei komplizierten Haut- und Weichgewebsinfektionen sowie bei schweren intraabdominellen Infektionen bei Erwachsenen erhielt [20, 21, 23]. Tigecyclin weist ein weites Wirkspektrum auf, das sowohl gram-positive und gram-negative Aerobier, als auch atypische Anaerobier und multiresistente Keime umfasst. Seine Wirkung beruht auf der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese, wobei Tigecyclin an die 30S-Untereinheit der Ribosomen bindet und somit die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA-Moleküle an die ribosomale Akzeptorstelle (A-Site) und damit den Einbau von Aminosäuren in die wachsende Peptidkette verhindert [21, 23, 27, 39, 40]. Zu den multiresistenten Erregern, gegen die Tigecyclin eine Wirkung zeigt, zählen folgende Spezies: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), Methicillin-resistenter *Staphylococcus epidermidis*, Vancomycin-resistenter *Enterococcus*, Penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae*, *Extended-Spectrum-Betalactamase* (ESBL)-bildende *Escherichia coli* und *Klebsiella* [12]. MRSA zeigt *in vitro* eine 98,9%ige Sensibilität gegen Tigecyclin

und *Enterococcus faecium* VRE eine 100%ige Sensibilität gegen Tigecyclin [33, 39]. Obwohl die Verwendung in nicht zugelassenen Bereichen nicht empfohlen wird, fand Tigecyclin bereits Gebrauch bei ambulant erworbener Pneumonie, nosokomialer Sepsis, Bakteriämie, Beatmungspneumonie und durch MRSA verursachte Osteomyelitis [27, 40]. Zusätzlich konnte *in vivo* und *in vitro* eine Aktivität von Tigecyclin gegen die akute myeloische Leukämie (AML) gezeigt werden [23, 27]. Zu beachten ist, dass es sich bei Tigecyclin um ein Reserveantibiotikum handelt. Die strenge Indikation für den Einsatz des Antibiotikums beruht auf dem Auftreten schwerer Nebenwirkungen, wie akuter Pankreatitis und Leberinsuffizienz mit bis zu tödlichem Ausgang [41]. Empfohlen werden bei komplizierten Haut-, Weichteil- und intraabdominellen Infektionen zunächst Carbapeneme, Kombipräparate aus auf Penicillin basierenden β -Lactamase Inhibitoren und Cephalosporine [39]. Da es nur wenige Erfahrungen mit der Anwendung von Tigecyclin bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus gibt, sollte eine Behandlung dieser Patientengruppe mit Tigecyclin mit besonderer Sorgfalt erfolgen [40].

Tigecyclin ist ein Derivat des Tetracyclins Minocyclin und wird halbsynthetisch hergestellt [33]. Der Unterschied zwischen dem Tetracyclin Minocyclin und dem Glycylcyclin Tigecyclin besteht in einer 9-tert-butyl-glycylamido Seitenkette, welche an Position 9 des D-Rings von Minocyclin angehängt ist (Abb. 1.1). Dieses bewirkt, dass der unter anderem bei *Escherichia coli* bestehende Resistenzmechanismus gegen Tetracycline, welcher aus einer Überproduktion von entsprechenden Efflux-Pumpen (*AcrAB multidrug efflux pump*) besteht und damit zum Auswärtstransport des Antibiotikums und zum Schutz der Ribosomen führt, aufgehoben wird [12, 39]. Allerdings ist auch Tigecyclin aufgrund einer extremen Überproduktion von entsprechenden bakteriellen Effluxpumpen unwirksam gegen *Pseudomonas aeruginosa* bzw. weniger wirksam gegen Erreger der *Proteeae*-Gruppe (z.B.: *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella spp.*) und *Acinetobacter baumannii* [40]. Eine Übersicht zum Wirkspektrum und den Resistenzen des Antibiotikums befindet sich in Tab. 1.1.

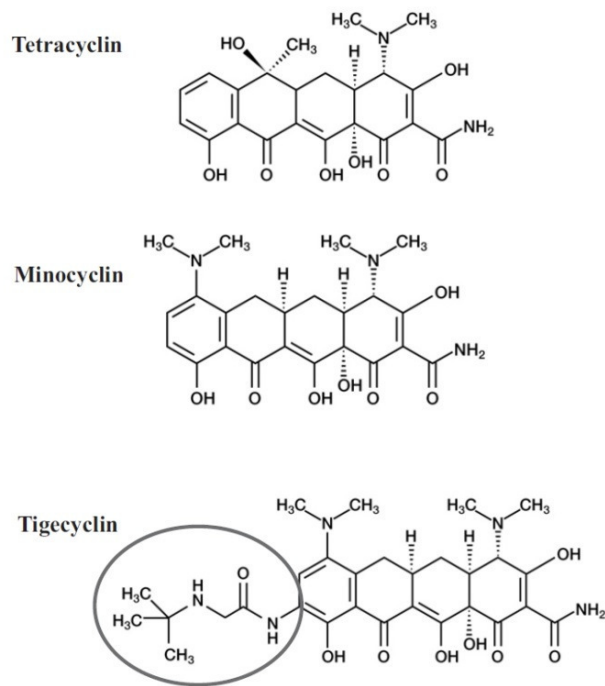


Abb. 1.1: Strukturformeln von Tetracyclin, Minocyclin und Tigecyclin (der eingekreiste Bereich stellt die 9-tert-butyl-glycylamido Seitenkette dar) [39].

Tab. 1.1: Wirkspektrum und Resistenzen vom Glycylcyclin Tigecyclin [41].

empfindliche Spezies	Spezies mit erworbenen Resistenzen	resistente Spezies
	Grampositive Aerobier	
<i>Enterococcus spp. (faecalis), Staphylococcus aureus / epidermidis / haemolyticus, Streptococcus agalactiae / anginosus / intermedius / constellatus / pyrogenes / viridans</i>		
	Gramnegative Aerobier	
<i>Citrobacter freundii / koseri, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca</i>	<i>Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia, Enterobacter aerogenes / cloacae, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Proteus spp., Providencia spp.,</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	Anaerobier	
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i>	<i>Bacteroides-fragilis</i> -Gruppe	

Tigecyclin besitzt einen logP-Wert von 0,8 und liegt bei physiologischem pH-Wert nahezu vollständig (>99,9%) als Anion vor [14]. In Studien mit radioaktiv markiertem Tigecyclin am Menschen konnten die Eliminationswege von Tigecyclin ermittelt werden. Primär wird Tigecyclin nach i.v. Applikation unverändert zu 59% über die Galle und Fäzes ausgeschieden. Sekundäre Eliminationswege bilden Glucuronidierung und zu 33% die renale Ausscheidung von unverändertem Tigecyclin über den Urin. Tigecyclin ist weder ein Substrat noch ein Inhibitor oder Induktor von Cytochrom-450 (CYP)-Isoenzymen und zeigt keine relevanten pharmakokinetischen Interaktionen mit anderen, intensiv über CYP-Isoenzyme metabolisierten Arzneistoffen wie dem Antikoagulant Warfarin. Eine Dosisanpassung in Bezug auf ein potentiell Interaktionsrisiko ist dementsprechend nicht notwendig [65]. Trotzdem wird bei zeitgleicher Einnahme von Antikoagulantien empfohlen, die Prothrombinzeit (PT) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) zu überwachen, da diese durch Tigecyclin potentiell verlängert werden können [12, 39, 40]. Inwiefern Tigecyclin ein Substrat von klinisch bedeutsamen Transportproteinen, wie des Effluxtransporters P-Glykoprotein (P-gp), ist, kann bislang nicht abschließend beurteilt werden. Obwohl Tigecyclin und das bekannte P-gp-Substrat Digoxin keine gegenseitigen Auswirkungen hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik besitzen, was für ein Fehlen der Interaktion von Tigecyclin mit P-gp sprechen würde, zeigen andere Studien, dass die parallele Gabe von Tigecyclin und dem P-gp-Substrat Ciclosporin zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Immunsuppressivums führen [41, 53, 56, 64]. Außerdem konnten in *in vitro* Studien in P-gp-überexprimierenden Zellen gezeigt werden, dass Tigecyclin ein Substrat von P-gp ist. Weitere mögliche Transporterproteine, welche den Transport und damit möglicherweise auch die Aufnahme, die Verteilung und die Elimination von Tigecyclin maßgeblich

beeinflussen, sind vor allem hepatozellulär und in der Niere exprimierte Transporterproteine, da Tigecyclin umfangreich über diese Organe ausgeschieden wird [40].

Insgesamt sind derzeitig mehr als 400 Membrantransporter beschrieben worden, welche in die zwei großen Subfamilien der *Adenosintriphosphat* (ATP)-*binding cassette* (ABC)-Transporter einerseits und in die der *solute carrier* (SLC)-Transporter andererseits unterteilt werden können. Während es sich bei den ATP-getriebenen Transportern ausnahmslos um Effluxpumpen handelt, welche Substanzen aktiv aus der Zelle auch gegen erhebliche Konzentrationsgradienten hinaus transportieren, sind die Transporter der SLC-Familie überwiegend, aber nicht ausschließlich, für die Aufnahme von Substanzen in die Zelle hinein zumeist nach dem Mechanismus der erleichterten Diffusion verantwortlich [15, 16].

In bereits vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Tigecyclin nach intravenöser Applikation über die Galle und den Urin ausgeschieden wird. Demnach muss das Antibiotikum über die Hepatozyten in die Galle oder das Blut gelangen, um eliminiert zu werden [40]. Möglicherweise spielen bei der Aufnahme von Tigecyclin hepatisch exprimierte Aufnahmetransporter aus der Familie der *organic anion transporter polypeptide* (OATP)-Transporter eine Rolle. Beim Menschen können 12 verschiedene OATP-Transporter mit einer Länge von 643 – 724 Aminosäuren unterschieden werden. Allen OATPs ist eine ähnliche tertiäre Struktur gemeinsam, die aus 12 Transmembrandomänen und einem großen fünften extrazellulären Loop besteht, welcher viele hochkonservierte Cysteinreste beinhaltet und der Zinkfinger-Domäne von Transkriptionsfaktoren ähnelt (Abb. 1.2) [18, 29]. Der Transportmechanismus der OATPs konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden, beruht aber vermutlich auf dem Prinzip des „*rocker-switch*“ Mechanismus (Abb. 1.3) und erfolgt elektonneutral und natriumunabhängig [2, 47].

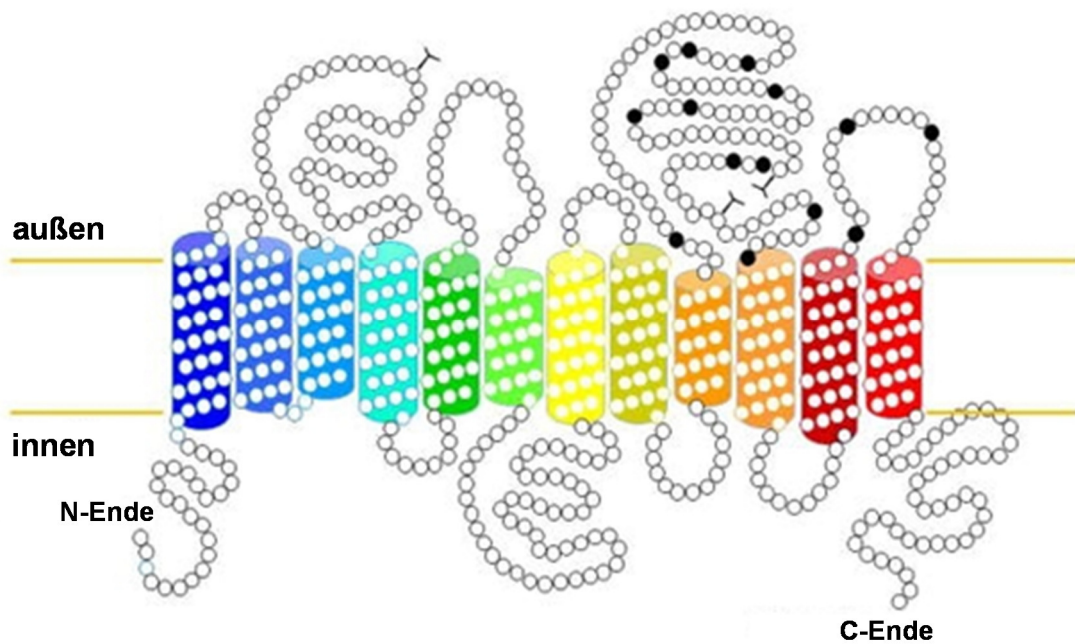


Abb. 1.2: Strukturmodell eines OATP1B1-Transporters mit zwölf Transmembran-domänen. Die schwarz gekennzeichneten Cysteinreste befinden sich auf der extrazellulären Seite [modifiziert nach 18].

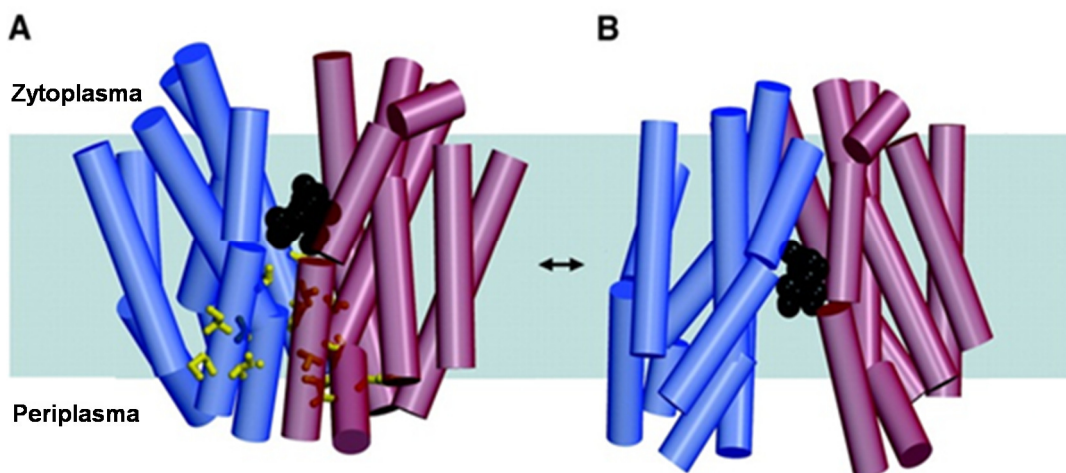


Abb. 1.3: Modell des „rocker-switch“ Mechanismus am Beispiel der bakteriellen Lactose Permease. Die N- bzw. C-terminale Domäne des Proteins ist in blau bzw. rot dargestellt. In A erkennt man die zum Cytosol hin geöffnete Konformation, während in B der Konformationswechsel zur Außenseite dargestellt ist. Das Substrat ist beispielhaft in schwarz eingezeichnet [modifiziert nach 2].

Ein weiteres Charakteristikum der OATPs ist ihr großes Spektrum an Substraten, wozu neben Gallensalzen, Steroidhormonen und

Schilddrüsenhormonen auch eine Vielzahl von Xenobiotika, wie Bromosulphophthalein oder verschiedene Statine, zählen [24, 47]. Obwohl es sich bei der überwiegende Anzahl der transportierten Substanzen um Anionen mit einem Molekulargewicht > 300 Dalton handelt, können verschiedene OATPs auch positiv geladene und neutrale Substanzen transportieren [8, 15, 16, 18, 36].

Während einige der OATPs, wie OATP2B1 oder OATP4A1, nahezu ubiquitär vorkommen, werden andere der OATPs organspezifisch exprimiert. Dazu zählen z.B. OATP1B1 und OATP1B3, welche überwiegend auf der sinusoidalen Membran der Hepatozyten exprimiert werden. Allerdings konnte auch eine schwache Expression von verkürzten Transporterproteinen (z.B. *cancer type* (Ct)-OATP1B3) in anderen Organen bzw. Tumoren (z.B. in Adenokarzinomen des Pankreas und Colons) nachgewiesen werden [29, 31, 36, 47].

Ein weiterer nur auf der Blutseite der Hepatozyten exprimierter Aufnahmetransporter ist der natriumabhängige *sodium taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP)-Transporter, der vor allem für die Aufnahme von Gallensäuren, aber auch für verschiedene Xenobiotika wie Gadoxetat verantwortlich ist [16, 32, 55].

Da Tigecyclin über die Niere und über die Galle ausgeschieden wird, müssen entsprechende Effluxtransporter, wie die *multidrug resistance associated proteins* (MRPs) 2 und 3, eingebunden sein. Diese gehören zu der Superfamilie der ABC-Transporter, welche aktiv unter Energieverbrauch durch ATP-Spaltung ihre Substrate von intrazellulär nach extrazellulär transportieren bzw. in intrazelluläre Kompartimente, wie das endoplasmatische Retikulum [13]. Die Familie der ABC-Transporter besteht aus 12 Mitgliedern [15, 16, 22]. MRPs kommen vor allem in sezernierenden Zellen, wie im Darm, der Leber und der Niere, vor. Die Entsorgung von metabolischen Produkten in die Galle wird beispielsweise über MRP2 gewährleistet [10]. Im proximalen Tubulus der Niere (apikale/ luminale Seite der renalen Zellen) und auf der apikalen Seite der Enterozyten (luminale Seite der intestinalen Zellen) und Hepatozyten (kanalikuläre Seite der Leberzellen) befinden sich unter anderem das MRP2 [16]. Dieser Transporter ist ein möglicher Kandidat für die biliäre Sekretion von Tigecyclin. MRP3 ist in den Enterozyten (basolaterale Seite) und auch auf der

basolateralen (sinusoidalen) Seite der Hepatozyten lokalisiert und befördert Substanzen hingegen in die systemische Zirkulation [16, 22].

Eine Übersicht über die in der Leber exprimierten Aufnahme- und Effluxtransporter, die möglicherweise für den Transport von Tigecyclin verantwortlich sind, sowie deren Substratspektrum sind in Abb. 1.4 und Tab 8.1 (s. Anhang unter Punkt 8.4) dargestellt.

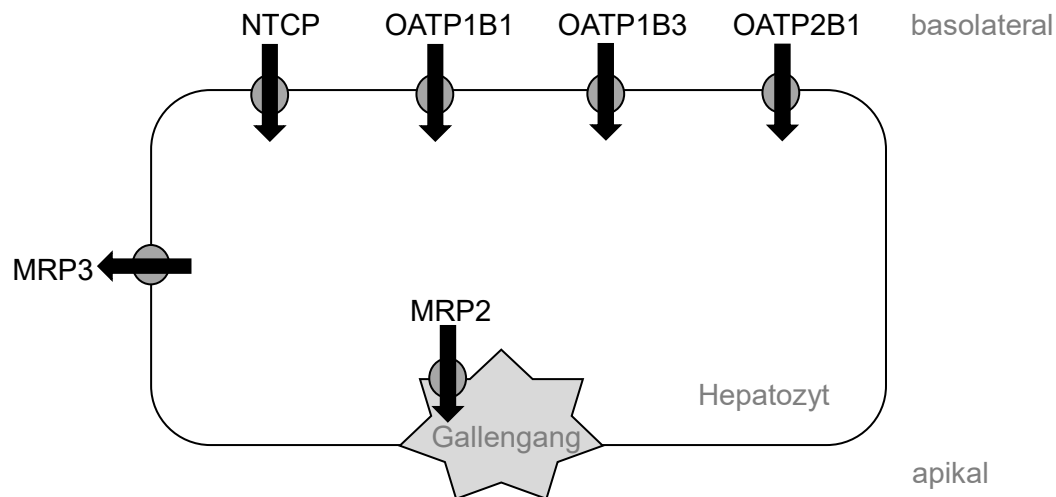


Abb. 1.4: Darstellung eines Hepatozyten mit humanen Aufnahmetransportern (OATP- und NTCP-Transporter) und ATP-abhängigen Effluxpumpen (MRP-Transporter) [16].

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Affinität von Tigecyclin zu hepatischen Aufnahme- und Effluxtransportern zu bestimmen. Da das Antibiotikum *in vivo* fast vollständig in ionisierter Form (>99,9%) vorliegt, müssen spezifische Transportmechanismen über Membranen existieren [14]. Der Fachinformation Tygacil® von Pfizer zum Wirkstoff Tigecyclin zufolge wird das Antibiotikum primär und unverändert zu ca. 59% biliär ausgeschieden. Unter Berücksichtigung der erwähnten physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffes muss davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der Substanz über die Leber in die Galle transportiert wird. Sekundärer Eliminationsweg von unverändertem Tigecyclin ist zu 33% die renale Ausscheidung. Die Gesamtkörperclearance von Tigecyclin bemisst sich auf etwa 400 ml/min, wobei die renale Clearance 13% davon ausmacht [40].

Da es unter der Behandlung mit Tigecyclin zu teils schwerwiegenden bis tödlich verlaufenden unerwünschten Wirkungen wie Leberinsuffizienz unbekannter Genese kommt, kann man annehmen, dass möglicherweise eine genetisch, umwelt- oder krankheitsbedingte Verminderung des Effluxtransporters des Antibiotikums zu hepatotoxischen Effekten beiträgt [40]. Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass genetische Varianten von MRP2 und MRP3 zu einer verminderten Ausscheidung von z.B. Gadoxetat führen kann [22]. Dementsprechend war es Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, anhand von geeigneten *in vitro* Zellmodellen einen möglichen Efflux von Tigecyclin über Mitglieder der MRP-Familie darzustellen. Zusätzlich sollten mögliche hepatozelluläre Aufnahmemechanismen an entsprechenden Zellmodellen untersucht werden.

Im Einzelnen sollten folgende Punkte dabei bearbeitet werden:

- a.) Ermittlung der inhibitorischen Effekte von Tigecyclin auf hepatische Aufnahmetransporter
- b.) Ermittlung der Affinität von Tigecyclin zu den hepatischen Aufnahmetransportern OATP1B1, -1B3, -2B1 und NTCP unter Verwendung von stabil transfizierten *human embryonic kidney* (HEK) 293-Zellen
- c.) Ermittlung der Affinität zu den ABC-Transportern MRP2 und MRP3

3. Material und Methoden

3.1 Tigecyclin

Für die Versuche wurde Tigecyclin hydrate $\geq 98\%$ (HPLC, *high performance liquid chromatography*) verwendet (Tab. 3.1). Synonyme des Antibiotikums Tigecyclin sind Tygacil[®], 9-tert-butylglycylamido-minocycline hydrate, GAR-936 und TBG-MINO [43]. Die Herstellung der Stammlösung von Tigecyclin in DMSO ist im Anhang unter Punkt 8.5.1 beschrieben.

Tab. 3.1: Informationen zur zu untersuchenden Substanz Tigecyclin [5, 41].

	Tigecyclin
Hersteller	Sigma-Aldrich [®] Chemie GmbH, Steinheim, D.
Lot-Nummer	110M4712V
Konzentration	10 mM
Lösungsmittel	Dimethylsulfoxid (DMSO) 1%ig
Lagerung	- 20 °C Kühlschrank
Reinheit	$\geq 98\%$
Form	Pulver
Farbe	weiß bis gelbbraun
Molekulare Masse	585,65 g/l

Zusätzlich zu den geplanten Aufnahme- und Wettbewerbsversuchen wurden diverse Tigecyclinproben analysiert, um optimale Bedingungen für die Substanz in Lösung zu ermitteln. Die Stabilität eines Antibiotikums ist unter anderem abhängig von Lagerungsbedingungen, wie beispielsweise Temperatur und Aufbewahrungsbehälter, und dem Lösungsmittel, mit dem das Medikament versetzt wird. Dazu wurde zunächst eine 10 mM Stammlösung Tigecyclin in DMSO zubereitet. Danach erfolgte in drei separaten Gefäßen eine tausendfache Verdünnung mit destilliertem Wasser, 0,9%iger Kochsalzlösung oder Inkubationspuffer. Anschließend wurden diese Proben jeweils nochmal auf zwei Gefäße vereinzelt, um bei 4 °C bzw. -80 °C gelagert zu werden. Nach 48 h erfolgte die analytische Vermessung mittels LC-MS/MS im Vergleich zu frisch angesetzten Proben.

3.2 Verwendete Zelllinien

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden *human embryonic kidney* (HEK) 293-Zellen verwendet. Bei den HEK293-Zellen handelt es sich um menschliche, unpolarisierte embryonale Nierenzellen, die eine Länge von etwa 20-30 μm erreichen. Die gut kultivierbare und für Transfektionsverfahren zugängliche Zelllinie wächst adhärent als Monolayer mit einer Verdopplungszeit von ca. 24 h [58].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, stabil transfizierten Zelllinien HEK- OATP1B1, -OATP1B3, -OATP2B1 und -NTCP sowie die entsprechende Vektor-transfizierte Kontrollzelllinie HEK-pQCXIN wurden am Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald generiert und charakterisiert [32]. Eine lichtmikroskopische Aufnahme einer HEK-OATP2B1 Zellkultur wird in Abb. 3.1 gezeigt.

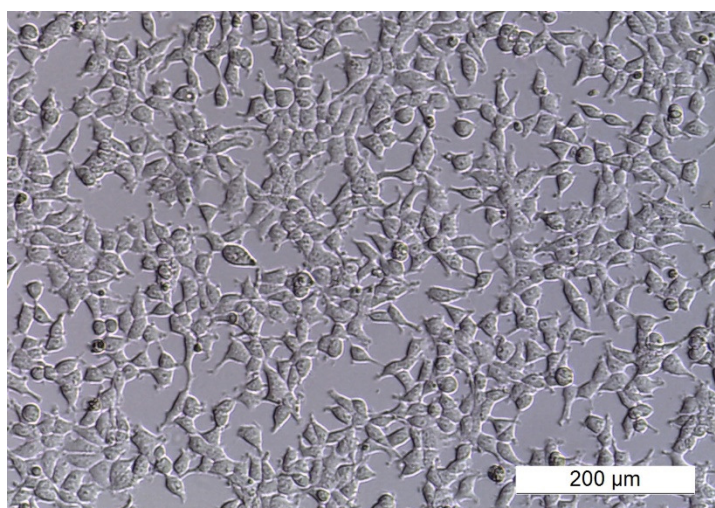


Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme einer HEK-OATP2B1 Zellkultur.

3.3 Zellkultivierung

Das Arbeiten an den Zellkulturen wurde stets unter einer Sterilwerkbank vorgenommen, um Kontaminationen möglichst zu vermeiden. Für ein ideales Wachstum erfolgte die Zellkultivierung in einem 95%igen wasserdampfgesättigten Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die Menge (Tab. 3.2) und die Art des Nährmediums (Tab. 3.3) den Zellen in den verschiedenen Zellkulturgefäßen angepasst. Die Zellzählung

wurde mit Hilfe des Gerätes TC10™ *Automated Cell Counter* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.) durchgeführt. Die Entwicklung und die Viabilität der Zellen wurden regelmäßig mit einem Lichtmikroskop überwacht. Das Nährmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Tab. 3.2: Menge an verwendetem Medium pro Zellkulturgefäß.

Zellkulturgefäß	10 cm-Platte	24 Well-Platte	96 Well-Platte
Medium [ml]	10	1	0,2

Tab. 3.3: Verwendetes Zellkulturmedium mit Zusätzen für HEK-Zellen.

HEK-Medium	Bezugsquelle
<i>minimum essential medium (MEM) with Earle's Salts without Glutamine</i> + 10% FKS + 1% stabiles Glutamin (2 mM) + 1% Penicillin/ Streptomycin + 1% nicht essentielle Aminosäuren (2 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Für die Langzeitlagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonserviert. Bei Gebrauch wurden die Kryoröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D.) zunächst in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und anschließend in mit Nährmedium (MEM mit Zusätzen, Tab. 3.3) gefüllte Falcon-Röhrchen (BD Bioscience, Ermbodegem, Belgien) überführt. Anschließend wurden diese bei 560 x g für 1,5 min bei 4 °C zentrifugiert. Um das zytotoxische Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.) des Einfriermediums zu entfernen, wurden die Überstände abgesaugt. Zuletzt wurden die Zellpellets mit je 10 ml Nährmedium resuspendiert und auf 10 cm Kulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht, D.) verteilt. Nach ca. 24 h erfolgte der erste Nährmediumwechsel. Altes Medium wurde abgesaugt und frisches, mit dem Selektionsantibiotikum G418 (Invivogen, Karlsruhe, D.) versetztes Medium hinzugegeben. Darüber hinaus enthielt das Medium Plasmocin™ (Invivogen, Karlsruhe, D.), welches eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen verhinderte (Tab 3.4).

Tab. 3.4: Stabil exprimierende Zelllinien und verwendete Antibiotika.

Zelllinien	Menge an G418 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Menge an Plasmocin [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
HEK-pQCXIN HEK-OATP1B1 HEK-OATP1B3 HEK-OATP2B1 HEK-NTCP	500	5

Da die HEK-Zellen einer Kontaktinhibition unterliegen und bei zu dichtem Wachstum absterben, wurden die Zellen bei einer über 70%igen Konfluenz passagiert. Dafür wurde zunächst altes Nährmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellkulturen mit je einmal 5 ml PBS (*phosphate buffered saline*) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von den Zellkulturschalen wurde Trypsin-EDTA-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verwendet. Die Zellen wurden in frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf und gewünschter Dichte auf neuen Zellkulturschalen ausgesät.

Vor dem Aussäen der Zellen auf 24-Well Zellkulturplatten für die Durchführung der Versuche wurden die Well-Platten zunächst mit Poly-D-Lysin (Massenkonzentration $\beta = 5 \text{ mg PDL} / 50 \text{ ml PBS}$) beschichtet. Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.) ist ein positiv geladenes Aminosäurenpolymer (Abb. 3.2). Durch die Adhäsion mit den negativ geladenen Ionen der Zellmembran bietet Poly-D-Lysin eine bessere Haftung der Zellen an den Well-Platten [19, 35]. Die Menge des Poly-D-Lysins ist dabei so zu wählen, dass die Oberfläche der Wells komplett benetzt ist (Tab. 3.5). Das Poly-D-Lysin in PBS wird für ca. 5 min auf der Welloberfläche belassen und dann wieder abgesaugt. Die Aussaat der Zellen auf 24-Well Platten erfolgte ohne Zugabe von Antibiotika [50].

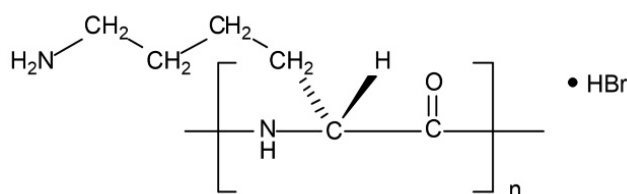


Abb. 3.2: Strukturformel Poly-D-Lysin [50].

Tab. 3.5: Menge an verwendetem Poly-D-Lysin pro Zellkulturgefäß.

Zellkulturgefäß	24 Well-Platte	96 Well-Platte
Poly-D-Lysin [μ l]	100	50

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, trypsieniert und pelletiert. Das Zellpellet wurde rasch in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium (90% fetales Kälberserum (FKS) + 10% DMSO) resuspendiert. Die Lagerung in Kryoröhrchen erfolgte zunächst für 24 h in mit Isopropanol gefüllten Gefrierboxen (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) bei -80 °C. Dieses Vorgehen ermöglicht ein gleichmäßiges und langsames Herunterkühlen mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 °C pro Minute. Nach ca. einem Tag wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

3.4 Proteinbestimmung

Zur Normierung der bei den Transportversuchen aufgenommenen Substratmengen wurde im Anschluss an jeden Versuch eine doppelte Proteinbestimmung mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™, Rockford, USA) zur Ermittlung des Gesamtproteins durchgeführt. Dabei wird in proteinhaltiger, alkalischer Lösung zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer reduziert und bildet mit je zwei BCA-Molekülen einen violetten Chelatkomplex aus (Abb. 3.3). Der violette Komplex absorbiert eine Wellenlänge von 562 nm. Mittels eines Photometers (Infinite® M200, Tecan, Crailsheim, Deutschland) konnte so nach 60-minütiger Inkubation die Gesamtproteinmenge quantitativ bestimmt werden [52].

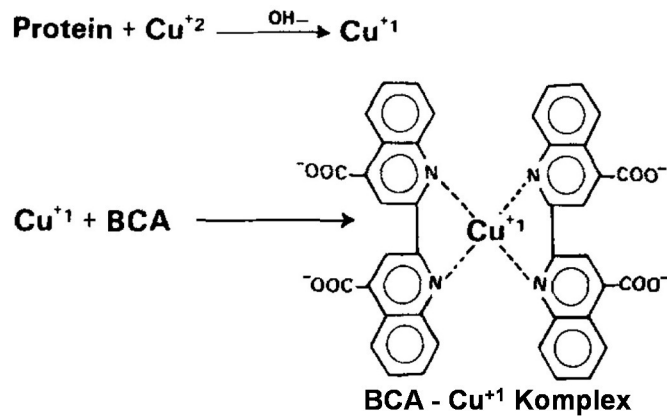


Abb. 3.3: Bildung eines violetten Chelatkomplexes aus zwei BCA-Molekülen und einwertigem Kupfer zur quantitativen Proteinbestimmung [modifiziert nach 52].

3.5 Zellviabilität

Um zytotoxische Effekte von Tigecyclin auszuschließen, wurden die Viabilität der Zellen bzw. die Zytotoxizität von Tigecyclin quantitativ mit Hilfe des Resazurinassays *PrestoBlue® Cell Viability Reagent* (Invitrogen, Karlsruhe, D.) gemessen. Resazurin ist ein blauer Redoxfarbstoff, der durch eine Reduktion in den Mitochondrien lebender Zellen zu rosafarbenem Resorufin umgewandelt wird (Abb. 3.4). In den Mitochondrien werden dabei Elektronen vom $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zum Resazurin überführt, welches so zu Resorufin reduziert wird und dabei zusätzlich noch H_2O bildet. Der Grad der Entfärbung korreliert daher mit der Zellviabilität [9].

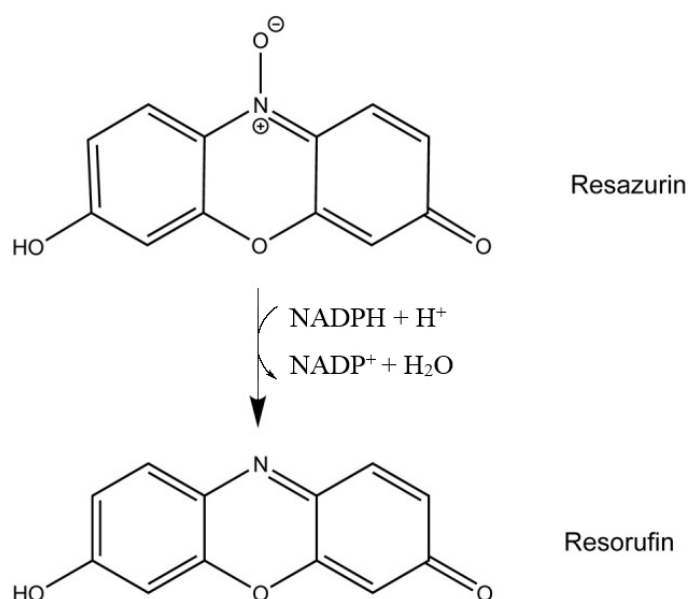


Abb. 3.4: Reduktion von Resazurin zu Resorufin beim Zellviabilitätsassay *PrestoBlue®* [48].

Für die Versuche wurden auf NUNC® *MicroWell™ 96 well polystyrene plates* (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) jeweils 20.000 Zellen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit in MEM + 10% *PrestoBlue* gelöstem Tigecyclin in einer Konzentration von 0 µM, 10 µM oder 100 µM inkubiert. Da die Stammlösung für Tigecyclin in DMSO angesetzt wurde, ergab sich für alle Versuche eine Endkonzentration von 1% DMSO. Nach den Inkubationszeiten von 0, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min wurde die Absorption der Lösung bei 570 nm (reduzierte Form) und 600 nm (oxidierte Form) im Plattenphotometer gemessen. Die in Prozent angegebene Viabilität der Zellen entspricht dem Anteil des reduzierten Resazurins in den mit Tigecyclin behandelten Proben im Verhältnis zur Vergleichsprobe, die nicht mit Tigecyclinlösung behandelt wurde [48]. Die Berechnung des reduzierten Resazurins wurde wie folgt vorgenommen:

$$R_{red} = (A_{570} - (A_{600} \cdot R_0)) \cdot 100\%$$

$$R_0 = \frac{\Delta A_{Med+Res-Med}^{570}}{\Delta A_{Med+Res-Med}^{600}} \quad \text{oder} \quad R_0 = \frac{\Delta A_{570}^{Med+Res-Med}}{\Delta A_{600}^{Med+Res-Med}}$$

R_{red} Anteil von reduziertem Resazurin in %

A_{570} / A_{600} Absorption der Proben bei 570 nm bzw. 600 nm

$\frac{\Delta A_{570}^{Med+Res-Med}}{\Delta A_{600}^{Med+Res-Med}}$ Differenz der Absorption von Medium mit und ohne Resazurin bei 570 nm und 600 nm

$$\frac{\Delta A_{Med+Res-Med}^{570}}{\Delta A_{Med+Res-Med}^{600}}$$

3.6 Untersuchung des Einflusses von Tigecyclin auf verschiedene Aufnahme- und Effluxtransporter

3.6.1 Versuche zu Aufnahmetransportern

3.6.1.1 Allgemeiner Versuchsablauf für Aufnahme- und Kompetitionsassays

Die Durchführung der Versuche erfolgte auf Poly-D-Lysin beschichteten 24-Well-Platten (BD Biosciences, Heidelberg, D.) (s. Punkt 3.3). Pro Well wurden 150.000 Zellen in antibiotikafreiem MEM ausgesät. Bei den Versuchen wurde stets auf Selektionsantibiotika verzichtet, da diese die Transportvorgänge beeinflussen können [63]. Nach zwei Tagen Kultivierung bei 37 °C erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80% bis 100%.

Zu Beginn jedes Transportversuches wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 37 °C warmen Inkubationspuffer (Zusammensetzung s. Anhang unter Punkt 8.3.2) gewaschen, um Mediumrückstände, die eventuell die Transportvorgänge stören könnten, zu entfernen [34, 49]. Zu jedem Well wurden 150 µl Inkubationslösung gegeben, in welcher sowohl die Substrate als auch mögliche Inhibitoren gelöst waren bzw. warme Reaktionslösung bestehend aus Tigecyclin in Inkubationspuffer. Nach Inkubation bei 37 °C wurde zum Abstoppen der Aufnahme drei Mal mit 4 °C kaltem Inkubationspuffer gewaschen [32].

Bei den zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahmeversuchen wurden nachfolgend auf jedes Well 600 µL DPBS pipettiert. Nach den Versuchen wurden die Proben bei -20 °C für ca. 24 Stunden eingefroren, bei Raumtemperatur aufgetaut, resuspendiert und mittels eines Ultraschall-Homogenisators *Bandelin Sonoplus* UW 2070 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D.) homogenisiert. Um die aufgenommene Menge von Tigecyclin auf das Gesamtprotein zu beziehen, wurden Proteinbestimmungen mit dem Pierce BCA® Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Bei nichtradioaktiv markierten Substanzen erfolgte die Quantifizierung mittels LC-MS/MS. Bis zur Messung der intrazellulär aufgenommenen Tigecyclinmengen erfolgte die Probenlagerung bei -80 °C.

Bei den Kompetitionsassays wurden im Anschluss an die Versuche zu jedem Well 500 µl Lysispuffer (s. Anhang unter Punkt 8.3.2) gegeben. Nach mindestens 30 min Schütteln auf einem Plattenschüttler wurden die Proben homogenisiert. Die quantitative Messung der intrazellulär aufgenommenen Substratmenge erfolgte bei radioaktiv markierten Substanzen mittels Flüssigszintillation. Dafür wurden je 100 µl homogenisiertes Zelllysate mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus®-Lösung, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.) in einem Szintillationsröhrchen Typ mini Vial C (5 ml) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.) gemischt und im β -Counter (*Liquid Scintillation Counter*®, Wallac 1409, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) vermessen. Dieser ermittelt frei werdende Energie in Form von β -Strahlung, die von den [^3H]-markierten Substraten an die Moleküle der Szintillationsflüssigkeit abgegeben werden. Die angeregten Szintillationsmoleküle werden dabei in einen energetisch höheren Zustand überführt (Primärszintillator) und übertragen einen Teil der Energie an weitere Moleküle (Sekundärszintillator). Beim Zurückfallen auf ein energetisch niedrigeres Niveau emittieren die Moleküle Photonen, die als Lumineszenz vom Szintillationszähler gemessen werden.

Die Aufnahme des Substrats in das Zellinnere wurde mit folgender Formel berechnet:

$$q_s = \frac{A_{\eta}^* \cdot 10^6}{A_{\text{spez}} \cdot t}$$

A_{η}^* korrigierte, normalisierte Aktivität in $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

A_{spez} spezifische Aktivität des markierten Substrats in Ci/mmol

q_s Substrataufnahme in $\text{pmol}/\text{mg} \cdot \text{min}$

t Inkubationszeit in min

Aus der Differenz der Substrataufnahme in die Transporter-transfizierten Zellen und der Substrataufnahme in die Vektor-transfizierten Zellen erhält man die reine Transporter-spezifische Aufnahme. Der Wert, bei dem 0 μM Tigecyclin vorlag, wurde als 100% Aufnahme festgelegt.

Zur Kontrolle der Zellfunktionalität wurden Aufnahmeassays mit bekannten $[^3\text{H}]$ -markierten Standardsubstraten und Standardinhibitoren (siehe 3.6.1.2) durchgeführt.

3.6.1.2 Wettbewerbsassays

Bei einem Wettbewerbsassay wird der Transport eines bekannten Standardsubstrats unter Ab- und Anwesenheit eines zweiten Substrates untersucht. Das zweite Substrat ist in der vorliegenden Arbeit Tigecyclin (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.), was in unterschiedlicher Konzentration dazugegeben wurde. Nimmt die aufgenommene Menge des bekannten Standardsubstrats unter Anwesenheit von Tigecyclin ab, bedeutet das, dass Tigecyclin den Substrattransport hemmt, jedoch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich dabei um eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung handelt (Pipettierschema und Plattenbelegung s. Anhang unter Punkt 8.5.3). Zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine, wurden in die Positivkontrollen mit Standardsubstrat bekannte Standardinhibitoren zu den Zellproben gegeben (Abb. 3.5) (s. Anhang unter Punkt 8.5.2).

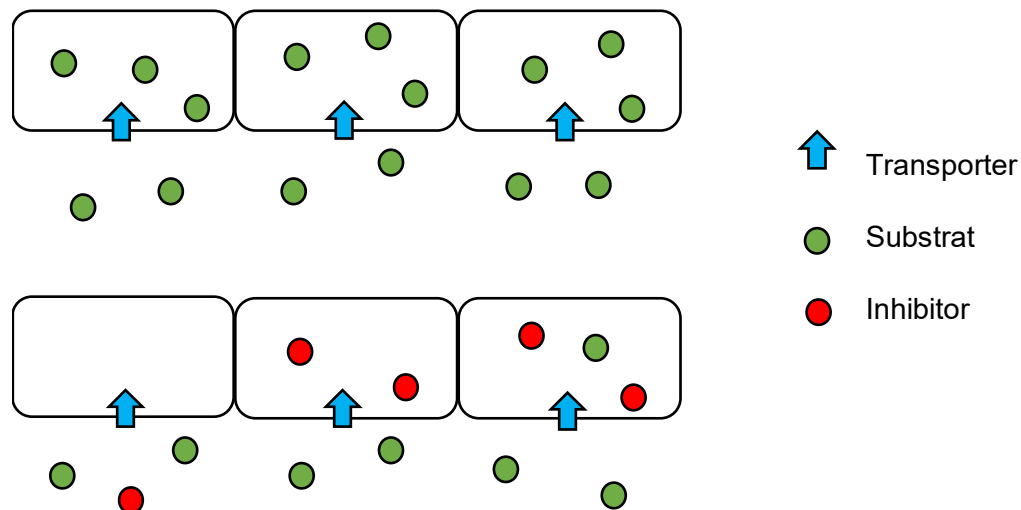


Abb. 3.5: Prinzip des Wettbewerbsassays: Transporter-vermittelte Aufnahme von Substrat (grün) in Abwesenheit (obere Abbildung) oder Anwesenheit (untere Abbildung) eines kompetitiven Transportinhibitors.

Für die Versuchsdurchführung wurde der verwendete Inkubationspuffer entsprechend der einzelnen Transporter sowohl mit einem bekannten Substrat in einer vorher definierten Konzentration als auch mit Tigecyclin in verschiedenen Konzentrationen (500 µM, 250 µM, 125 µM, 100 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,63 µM, 10 µM, 7,813 µM, 3,9 µM, 1,95 µM, 0,98 µM, 0,49 µM) versetzt. Pro ml Inkubationslösung wurde zur Quantifizierung der aufgenommenen Substanz 0,25 µCi Tritium ($[^3\text{H}]$)-markiertes Substrat (Tab. 3.6) hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten.

Tab. 3.6: Verwendete Standardsubstrate und Standardinhibitoren zur Überprüfung der Zellfunktion.

Transporter	Substrat	Konzentration Substrat	Konzentration $[^3\text{H}]$ -Substrat	Inhibitor (je 500 µmol/l)
OATP1B1	Estron-3-Sulfat	1 µmol/l	5 nmol/l	Rifampicin
OATP1B3	BSP	1 µmol/l	10 nmol/l	Rifampicin
OATP2B1	Estron-3-Sulfat	1 µmol/l	5 nmol/l	Rifampicin
	oder BSP	1 µmol/l	10 nmol/l	Rifampicin
NTCP	Taurocho-lat	10 µmol/l	54,3 nmol/l	BSP

3.6.1.3 Aufnahmeassays

Im Anschluss an die Kompetitionsassays wurden Aufnahmeassays mit den vorliegenden, stabil transfizierten Zellen durchgeführt, die zeigen sollen, ob Tigecyclin ein Substrat für die genannten Aufnahmetransporter ist. Allgemein dienen entsprechende Assays dazu, sowohl die v_{max} (maximale Transportkapazität) als auch die K_m (Michaelis-Menten-Konstante) zu erfassen. Mit zunehmender Substratmenge steigt die Transportkapazität an und nähert sich dem Maximum (v_{max}) an. v_{max} entspricht also der Kapazität, bei der die Sättigung des Substrattransporters erreicht ist. K_m ist die

Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Transportkapazität ($v_{\max}/2$) erreicht ist. Die Affinität des Substrates an den Transporter entspricht K_m und hat die Einheit [mol/l]. Je kleiner K_m ist, desto größer ist die Affinität des Substrates zum Transporter. Dieser Zusammenhang wurde ursprünglich für Enzyme entwickelt, kann aber auch auf Transportproteine und Transporter-Substrat-Komplexe übertragen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer Voruntersuchung zunächst lediglich zwei Konzentrationen von Tigecyclin (10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$) für je 5 und 20 Minuten auf die Zellen gegeben (Plattenbelegungen und Pipettierschemata s. Anhang unter Punkt 8.5.4).

3.6.2 Vesikelassays der Effluxtransporter

Mit Hilfe von Vesikelassays wurde der Transport von Tigecyclin über die ATP-abhängigen Effluxtransporter MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2*) und MRP3 (*multidrug resistance associated protein 3*) untersucht. Dazu wurden sowohl Aufnahmeassays als auch Kompetitionsassays durchgeführt. Die dafür verwendeten *inside-out*-Vesikel wurden aus den Membranen von transfizierten Sf-9-Zellen, die von Ovarialzellen der Nachtfalterart *Spodoptera frugiperda* stammen, isoliert und kommerziell erworben (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Das Prinzip der Vesikelassays beruht auf einer Zerkleinerung der äußeren Zellmembran mit anschließender Vesikelbildung, bei der sich bei ca. 50% der Vesikel die zuvor innen liegenden Bindungsstellen für Substrate und ATP nun außen befinden (Abb. 3.6) [10].

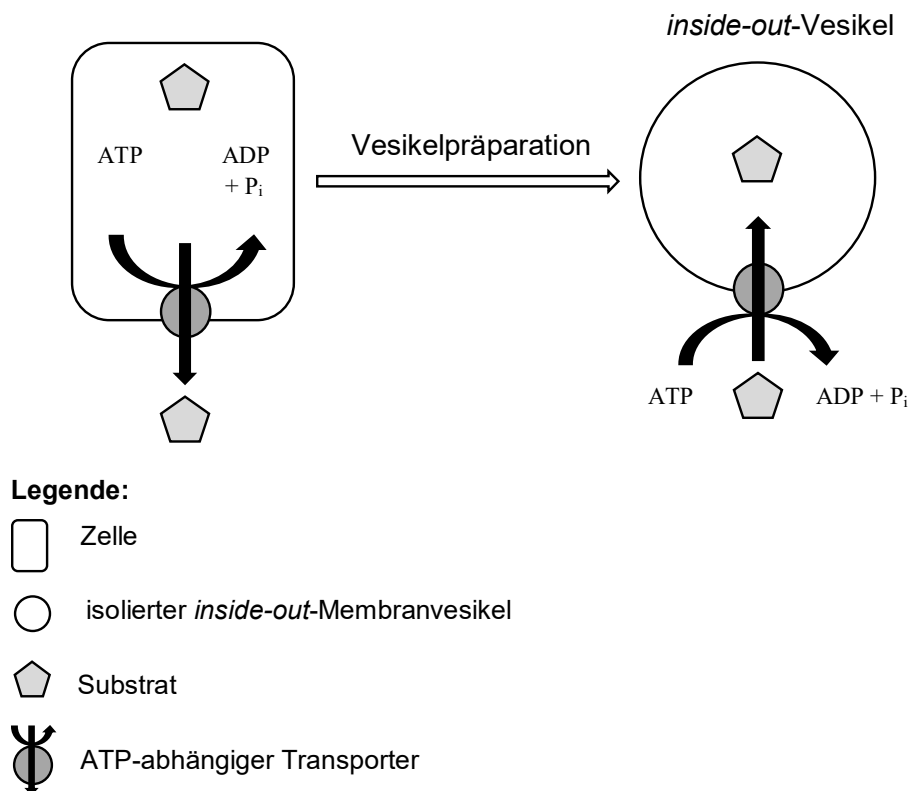


Abb. 3.6: Prinzip des Substrattransportes in isolierten *inside-out*-Lipovesikeln aus Sf-9-Zellenmembranen von Ovarialzellen einer Nachtfalterart [10].

Bei dem Kompetitionsassay mit MRP2- und MRP3-Vesikeln wurde der Transport der [³H]-markierten Referenzsubstanz Estradiol-17-β-Glucuronid ([³H]-E-17β-Gln) (Hartmann Analytic, Braunschweig, D.) in An- und Abwesenheit von 100 μM Tigecyclin untersucht [10]. Nimmt die aufgenommene Menge des bekannten Standardsubstrats unter Vorhandensein von Tigecyclin ab, bedeutet das, dass Tigecyclin den Substrattransport hemmt. Pro Vesikeltyp wurden insgesamt vier Proben angesetzt, wobei eine AMP als Negativkontrolle, eine ATP als Postivkontrolle, eine ATP + den Referenzinhibitor MK-571 (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.) und eine ATP + Tigecyclin enthielt. Vor dem Reaktionsstart wurden die Proben jeweils für 1 Minute auf einen 37 °C warmen Schüttelheizblock *ThermoCell Mixing Block* MB-102 (Bioer Technology Co., Hangzhou, China) gestellt. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von jeweils 20 μl aus einem Gemisch von Creatinkinase (CK) (LabAgents, Friedrichsdorf, D.), [³H]-E-17β-Gln und ATP bzw. AMP in das Gemisch aus MRP2-Vesikeln bzw. MRP3-Vesikeln, Tris-Sucrose (TS) und ggfs. MK-571 bzw. Tigecyclin (s. Anhang unter Punkt 8.5.5). Der Versuch erfolgte ebenfalls

auf dem Heizblock bei 37 °C und 600 rpm. Nach 10 Minuten Inkubation wurden zum Reaktionsstopp jeweils 20 µl der Gemische mit je 1 ml eisgekühlter Tris-Sucrose versetzt. Anschließend wurden die Proben auf mit Tris-Sucrose angefeuchtetes Nitrocellulose-Papier Membranfilter Millipore (Fischer Scientific GmbH, Schwerte, D.) pipettiert, mit je 5 ml Tris-Sucrose gespült und druckgefiltert. Dazu wurde eine *Millipore® Vacuum Filtration Cell Harvester* (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D.) verwendet. Das Filtern dient dazu, nur die ggfs. mit Substrat beladenen Vesikel aus dem Probengemisch zu extrahieren. Zur quantitativen Bestimmung des aufgenommenen [³H]-E-17β-Gln wurden die Filter mit je 5 ml Rotiszint® eco plus-Universalcocktail überschichtet und nach mindestens 30 minütiger Inkubationszeit mittels Flüssigszintigraphie vermessen.

Um zu überprüfen, ob Tigecyclin ein Substrat von MRP2 bzw. MRP3 ist, wurden 100 µM Tigecyclin zu einer Positivkontrolle mit ATP, zu einer Negativkontrolle mit AMP und einer Probe mit dem bekannten Standardinhibitor MK-571 gegeben (s. Anhang unter Punkt 8.5.5). Die Aufnahmeassays wurden analog zu den Kompetitionsassays durchgeführt. Nach der Druckfiltration der Proben wurden die Filter bei -80 °C gelagert und die aufgenommene Menge Tigecyclin mittels LC-MS/MS bestimmt.

3.7 Analytik mittels LC-MS/MS

Die Analytik der Versuchsproben mittels LC-MS/MS wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Stefan Oswald und Herrn Dr. Eberhard Scheuch mit Unterstützung durch Frau Anja Moll aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie am Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt. Die LC-MS/MS ist ein Verfahren, bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Tandemmassenspektrometrie kombiniert sind. Die Proben werden dabei flüssigkeitschromatographisch nach molekularen Eigenschaften wie Molekülgröße und Ladung aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch detektiert. Das LC-MS/MS-Verfahren ist eine validierte Messmethode mit interner *standard operating procedure* (SOP) im GLP-zertifizierten analytischen Labor der Klinischen Pharmakologie der Universität Greifswald.

3.8 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden als Triplikate, und sofern nicht anders erwähnt, zweimal durchgeführt. Mit der Software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad, San Diego, USA) erfolgten die Darstellung und Auswertung der Stabilitätsuntersuchungen, der Aufnahme-, Kompetitions- und Vesikelassays sowie die Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} -Wert) mittels nicht-linearer Regression. Der IC_{50} -Wert entspricht der Konzentration von Tigecyclin, bei der die halbmaximale Hemmung der Standardsubstrataufnahme auftrat. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Angabe der IC_{50} -Werte erfolgt je mit dem oberen und unteren Intervall der Standardabweichung.

Zur Berechnung von Signifikanzen der Versuchsergebnisse wurden der ANOVA-Test (*analysis of variance*, Varianzanalyse) oder der *t*-Test verwendet. Beide Tests vergleichen die Mittelwerte von zwei unabhängigen Gruppen und geben Auskunft darüber, ob Unterschiede signifikant sind. Die Signifikanzberechnung entscheidet darüber, ob eine Nullhypothese abgelehnt und eine Alternativhypothese akzeptiert wird. Sind beide Mittelwerte gleich, tritt die Nullhypothese ein. Ein signifikantes Ergebnis liegt vor, wenn beide Mittelwerte nicht gleich sind. Ob ein Ergebnis signifikant ist, d.h. ob der Unterschied zwischen zwei Ergebnissen zu groß ist, um noch als zufällig zu gelten, hängt vom Signifikanzniveau (*p*-Wert) ab. Der *p*-Wert ist eine Wahrscheinlichkeit und kann daher Werte zwischen Null und Eins annehmen. Je kleiner der *p*-Wert ist, desto unwahrscheinlicher ist die Nullhypothese. Standardmäßig wird das Signifikanzniveau mit 5% ($p < 0,05 = *$) definiert. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein positives Ergebnis durch Zufall zustande kommt, unter 5% liegt (Irrtumswahrscheinlichkeit, α -Fehler). Beim *one-way* ANOVA-Test wird die F-Verteilung, auch Fisher-Verteilung genannt, eingesetzt. Sie dient dem Vergleich von Varianzen. Die empirische Varianz beschreibt die mittlere quadratische Abweichung der einzelnen Messwerte vom Mittelwert. Der *one-way* ANOVA-Test bietet allerdings nur eine begrenzte Aussagemöglichkeit und zwar, dass zwei Gruppen ungleich zueinander sein können. Er bietet aber keine Aussage darüber, welche Gruppe sich statistisch unterscheidet [4, 11, 54].

4. Ergebnisse

4.1 Funktionalität der Zellen

Die Prüfung der Zellfunktionalität wurde bei jedem Zellversuch als Triplikat durchgeführt. Ein Versuch wurde als gültig bewertet, wenn die jeweilige Referenzsubstanz eine deutlich höhere Aufnahme in den Transporterprotein-transfizierten Zellen aufwies als in den Vektor-transfizierten Kontrollzellen und die Aufnahme gleichzeitig durch einen geeigneten Inhibitor gehemmt werden konnte. Eine beispielhafte Übersicht über die entsprechenden Kontrollversuche findet sich in Abb. 4.1.

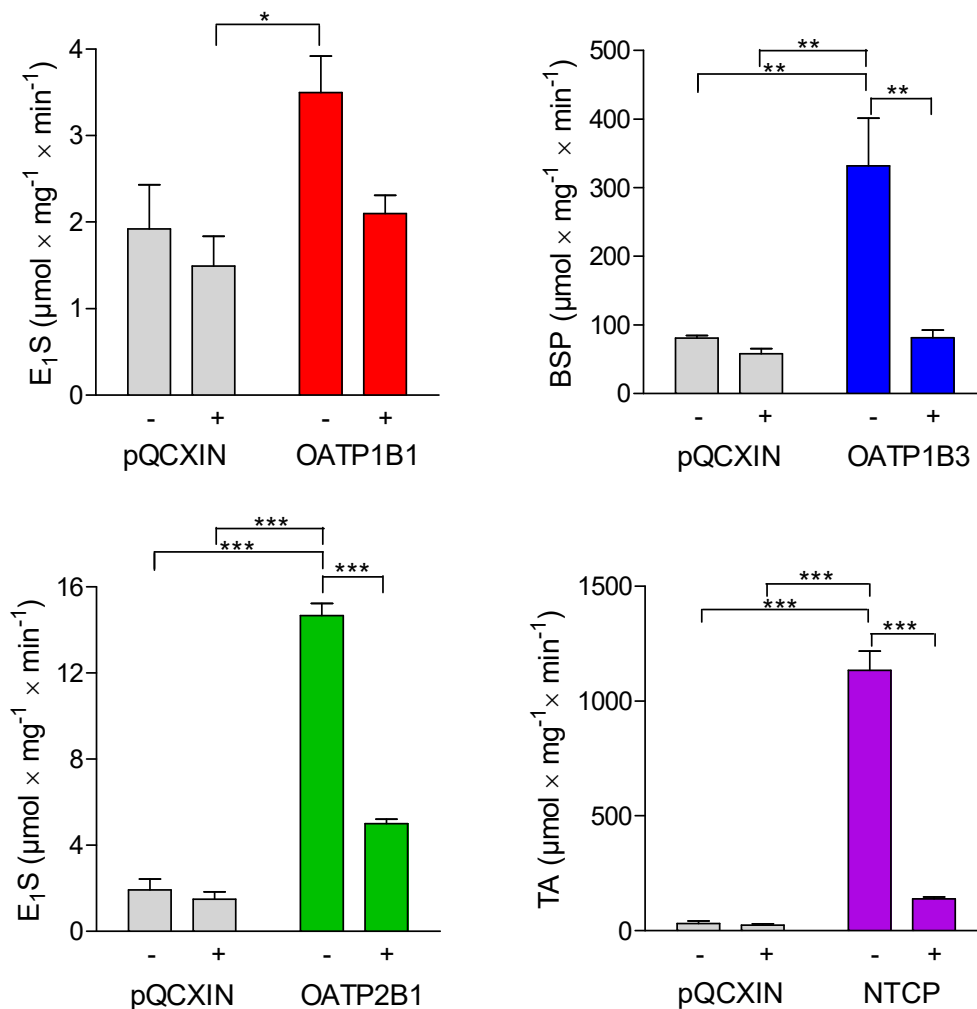


Abb. 4.1: Funktionalitätsprüfung der Transporter-transfizierten HEK293-Zellen mit bekannten Standardsubstraten und Inhibitoren (s. Punkt 3.6.1.2) (+ \triangleq mit Inhibitor, - \triangleq ohne Inhibitor) (n = 1 im Triplikat). (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

4.2 Überprüfung der Stabilität von Tigecyclin

Bei der Untersuchung der Stabilität von Tigecyclin in verschiedenen Lösungsmitteln und bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen konnte gezeigt werden, dass in Wasser oder Inkubationspuffer gelöstes Tigecyclin nach einer 48-stündigen Lagerung bei -80 °C stabil ist. Eine Lagerung bei 4 °C führte jedoch bei allen verwendeten Lösungsmitteln (Wasser, 0,9%ige Kochsalzlösung und Inkubationspuffer) zu erheblichen Stabilitätsverlusten von bis zu 93,6%. Zudem erwies sich Inkubationspuffer als besser geeignetes Lösungsmittel für Tigecyclin als 0,9%ige Kochsalzlösung. Die Stabilität des Antibiotikums in den genannten Lösungsmitteln nach 48-stündiger Lagerung bei 4 °C bzw. -80 °C wird in Abb. 4.2 im prozentualen Vergleich zu frisch angesetzten Proben (\triangleq 100% Stabilität) gezeigt.

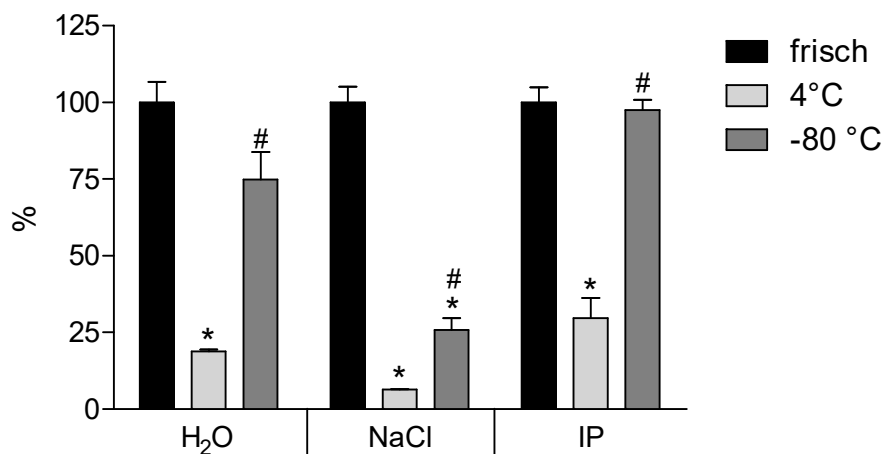


Abb. 4.2: Stabilität von Tigecyclin in Wasser, 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl) und Inkubationspuffer (IP) nach 48-stündiger Lagerung bei 4 °C bzw. -80 °C im Vergleich zu frisch angesetzten Proben (n = 2). (*p<0.05 vs. frisch, #p<0.05 vs. 4 °C).

4.3 Viabilitätsassay

Im Toxizitätsassay konnte gezeigt werden, dass Tigecyclin bis zu einer Konzentration von 100 µmol/l und einer Inkubationszeit von 120 min keinen zytotoxischen Effekt auf die Vektor- und Transporter-transfizierten HEK293-Zellen aufweist. (Tab. 4.1 und Abb. 4.3). Abweichungen der Viabilität von \pm 15% wurden als Messtoleranz akzeptiert. Eine Übersicht der vollständigen

Ergebnisse des Toxizitätsassays mit Tigecyclinkonzentrationen von 0 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ und Inkubationszeiten von 0, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min findet sich im Anhang unter Punkt 8.6.1.

Tab. 4.1: Zellviabilität von HEK293-Zellen im *PrestoBlue*[®] Toxizitätsassay nach 120-minütiger Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Tigecyclin (n = 2 im Triplikat).

Zelllinie	Viabilität	
	Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]
pQCXIN	93	11
OATP1B1	105	17
OATP1B3	111	13
OATP2B1	104	9
NTCP	98	3

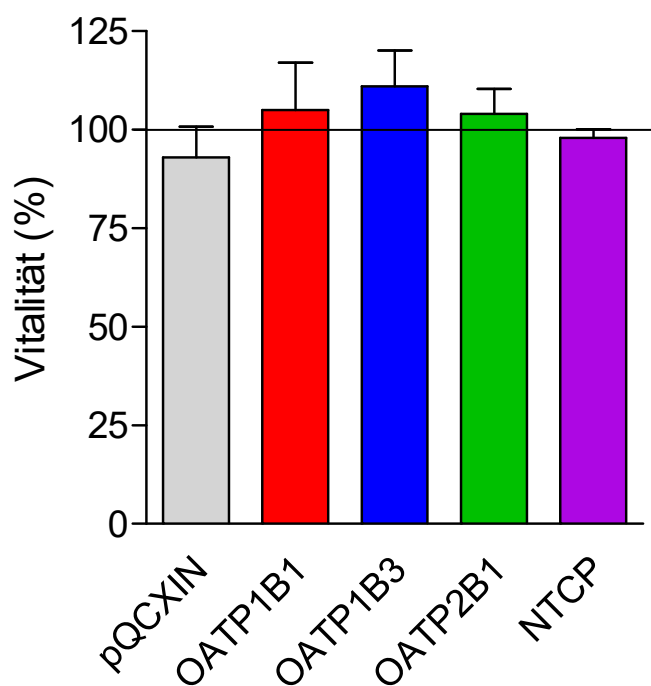


Abb. 4.3: Zellviabilität von HEK293-Zellen im *PrestoBlue*[®] Toxizitätsassay nach 120-minütiger Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Tigecyclin (n = 2 im Triplikat).

4.4 Kompetitionsassays der Aufnahmetransporter

In den Kompetitionsassays wies Tigecyclin eine Hemmung der Aufnahme des jeweiligen Referenzsubstrates in OATP1B3- ($IC_{50} = 37,2$ (12,7; 109) $\mu\text{mol/l}$) und -2B1- ($IC_{50} = 33,5$ (18,2; 61,6) $\mu\text{mol/l}$) exprimierenden HEK293-Zellen auf (Abb. 4.4).

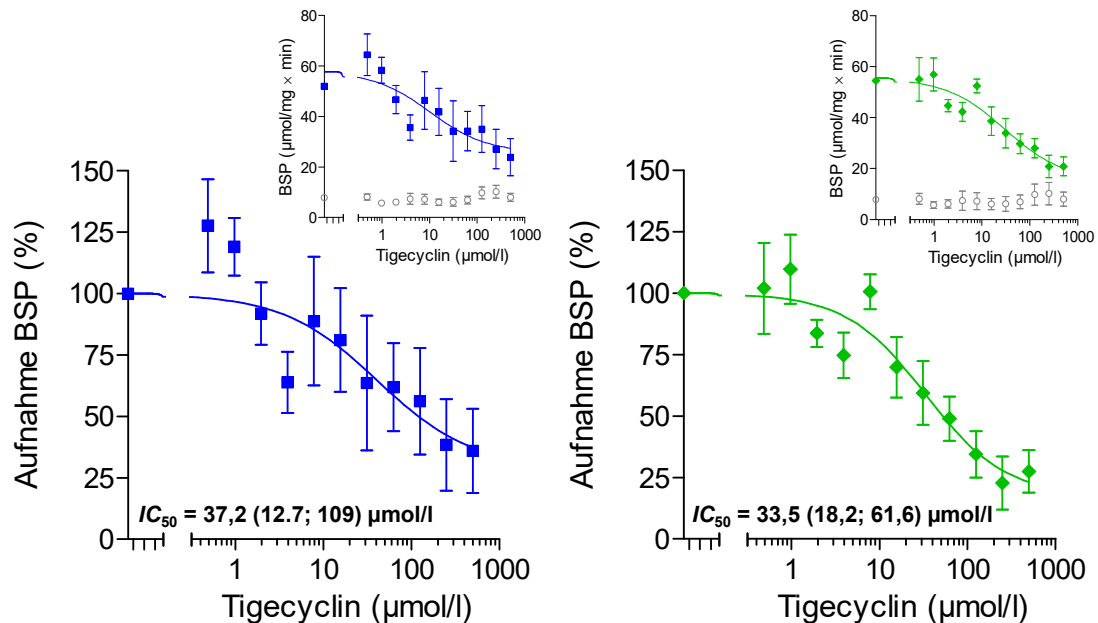


Abb. 4.4: Konkurrenz der Aufnahme des Standardsubstrates BSP mit Tigecyclin in OATP1B3- (blau) und -2B1- (grün) exprimierenden HEK293-Zellen nach 5-minütiger Inkubation. Die kleinen Abbildungen stellen die Bruttoaufnahmen in den Transporterprotein-transfizierten und den Vektor-transfizierten Kontrollzellen (grau) dar (n = 3 im Triplikat).

Bei den Versuchen in HEK-OATP1B1 und -NTCP Zellen zeigte sich hingegen keine Reduktion der Standardsubstrataufnahme durch die Zugabe von Tigecyclin (Abb. 4.5).

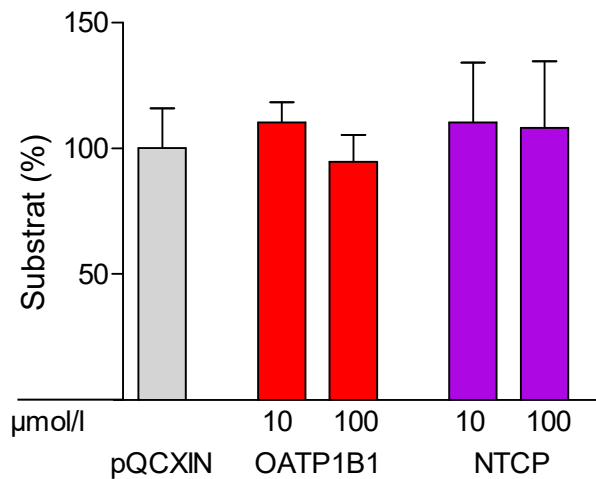


Abb. 4.5: Konkurrenz der Aufnahme von Standardsubstraten mit Tigecyclin in OATP1B1- und NTCP-exprimierenden HEK293-Zellen nach 5-minütiger Inkubation (n = 2 im Triplikat).

4.5 Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahme

Tigecyclin wies sowohl in geringer (10 µmol/l) als auch in höherer Konzentration (100 µmol/l) bereits nach 5 Minuten einen deutlichen OATP2B1-vermittelten Transport auf, der durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 20 Minuten nicht gesteigert werden konnte. OATP1B1-, OATP1B3- und NTCP-transfizierte Zellen zeigten lediglich eine schwache Aufnahme von Tigecyclin nach 20 Minuten, die nicht signifikant gegenüber der Aufnahme in Vektor-transfizierte Kontrollzellen war (Abb. 4.6). Weiterführende Untersuchung zur Bestimmung der Affinität (K_m) und der Transportkapazität (v_{max}) konnten aufgrund der zeitlichen Limitierung der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden.

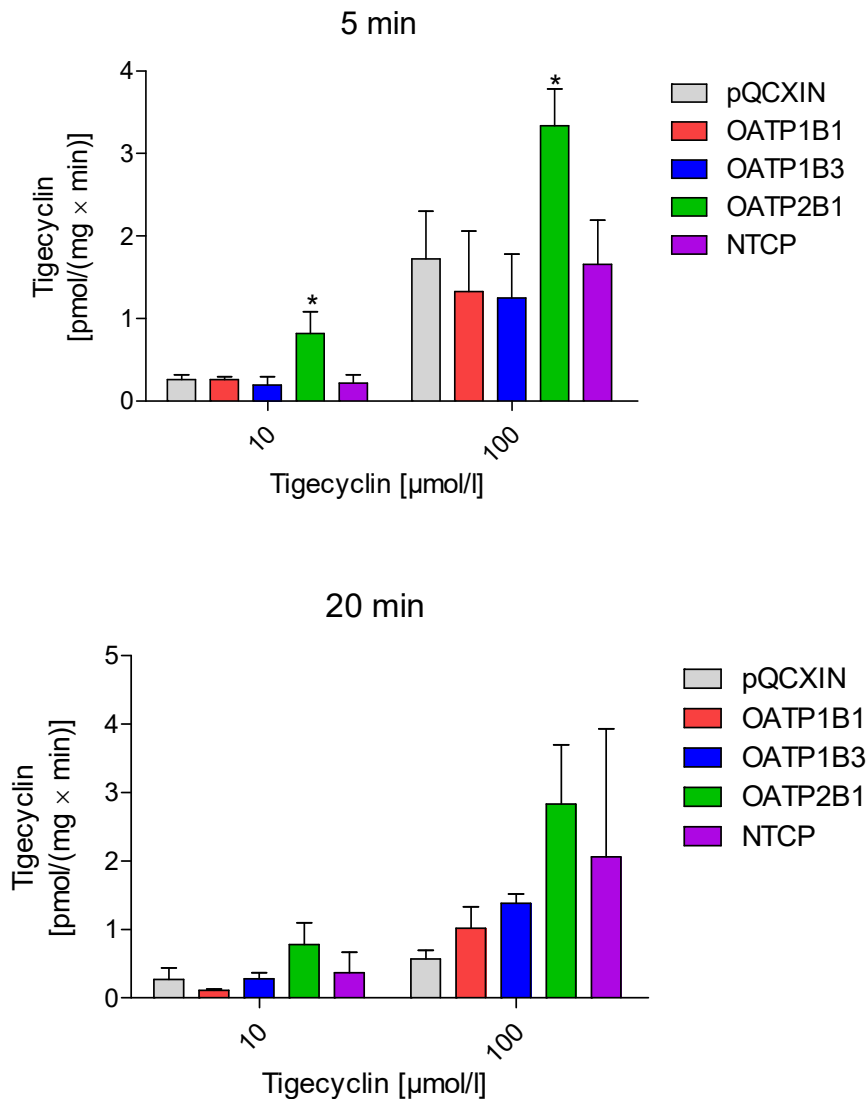


Abb. 4.6: Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeversuche in Transporter-transfizierten HEK293-Zellen mit 10 µmol/l bzw. 100 µmol/l Tigecyclin und einer 5- bzw. 20-minütigen Inkubation (n = 2 im Triplikat). (*p<0.05 vs. pQCXIN).

4.6 Vesikelassays der Effluxtransporter

In den Kompetitionsassays an MRP2 und MRP3 exprimierenden *inside-out*-Lipovesikeln zeigte Tigecyclin eine deutliche Hemmung der MRP2- bzw. MRP3-vermittelten Aufnahme der Referenzsubstanz E-17β-Gln (Abb. 4.7). Diese war allerdings deutlich geringer als die hemmende Wirkung des Referenzinhibitors MK571, welcher die Aufnahme von E-17β-Gln signifikant hemmte. Eine Bestimmung der IC_{50} bzw. die Bestimmung der Affinität zu den genannten Effluxtransportern konnte aufgrund der zeitlichen Limitierung der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden.

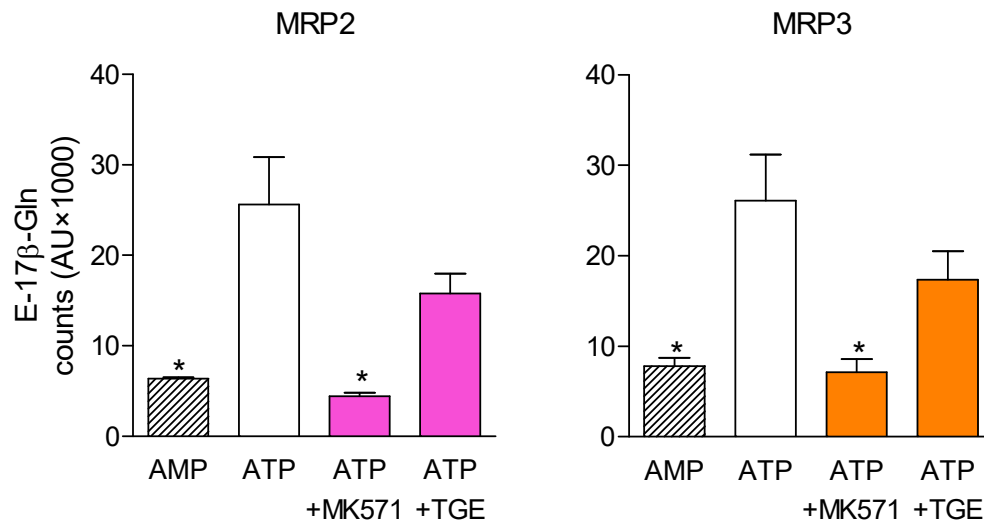


Abb. 4.7: Kompetitionsassay mit Tigecyclin in MRP2- und MRP3-Vesikeln (n = 2 im Triplikat). (*p<0.05 vs. ATP).

5. Diskussion

Die Resorption, Verteilung und Elimination von Arzneistoffen im menschlichen Organismus wird durch verschiedene Transportproteine, der SLC-, SLCO- und ABC-Familie, maßgeblich beeinflusst. Die Expression der erwähnten Transporter kann dabei durch (epi)genetische, krankheits- oder umweltbedingte Faktoren erheblich variieren und zu großen interindividuellen Unterschieden in der Pharmakokinetik von Transportersubstraten beitragen. Die Expression der leberspezifischen Transporter OATP1B1 und OATP1B3 wird z.B. durch den Transkriptionsfaktor HNF1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 α*) kontrolliert. Außer Xenobiotika, wie Statine, Antibiotika und Herzglykoside, werden auch endogene Substanzen, wie Gallensäure oder Hormone, über OATP-Transporter befördert. Die zelluläre Exposition und somit die Wirksamkeit oder Toxizität der entsprechenden Substrate wird zudem durch die Funktion von Effluxtransportern, wie MRP2 oder P-gp, beeinflusst. Diese ABC-Transporter vermögen Stoffe aktiv aus einer Zelle heraus zu transportieren. Neben dem erwähnten Zusammenspiel von Aufnahme- und Effluxtransportern kann die lokale und globale Pharmakokinetik eines Arzneistoffes auch in erheblichem Umfang von metabolisierenden Enzymen beeinflusst werden. Aus diesem Szenario resultiert ein beträchtliches Risiko für unerwünschte Arzneimittel-Wechselwirkungen. Werden beispielsweise Arzneistoffe appliziert, die als Induktoren oder Hemmstoffe intestinaler oder hepatischer Arzneistofftransporter oder Biotransformationsenzyme fungieren, wird die Pharmakokinetik gleichzeitig eingenommener Pharmaka, die Substrate der betroffenen Enzyme und Transporter sind, erheblich verändert. Unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass ältere Patienten heute häufig eine Vielzahl an Arzneimitteln gleichzeitig einnehmen, birgt dies nicht unbeträchtliche Risiken durch die Variabilität der Wirkung von Arzneimitteln und dem daraus folgendem Auftreten schwerer Nebenwirkungen. Eine weitere Ursache für die interindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik und Wirkung von Arzneistoffen sind genetische Polymorphismen von Transportproteinen und Metabolisierungsenzymen [60]. Extreme Fälle hierfür sind die beim Menschen vorkommenden Transporterdefizienzsyndrome, wie das Rotor-Syndrom (OATP1B1-Defizienz) oder das Dubin-Johnson-Syndrom (MRP2-Defizienz) [38, 59]. Aus vergangenen Studien ist zudem bekannt, dass die

Expression von Transportern auch durch pathologische Umstände beeinflusst werden kann. So ist die Expression von hepatischen Effluxtransportern, wie MRP3 oder BSEP (*bile salt exporting pump*), bei Cholestase erhöht, wohingegen hepatische Aufnahmetransporter der OATP-Familie deutlich reduziert exprimiert vorliegen und somit einer zunehmenden Ansammlung zytotoxischer Gallensäuren entgegen wirken. Ein anderes Beispiel stellt die herabgesetzte Expression von OATP1B3-Transportproteinen im Gewebe von hepatozellulären Karzinomen (Lebertumoren) dar, wohingegen in Ovarien, die für gewöhnlich keine OATP1B1- und OATP1B3-Transporter exprimieren, im Fall von Ovarialzellkarzinomen diese Transporter identifiziert wurden [15, 16, 18, 24, 47].

Kenntnisse über das Zusammenspiel von Aufnahme- und Effluxtransportern sowie deren Expressionsmuster, Aktivität und Substratspektrum bilden daher einen zentralen Forschungsschwerpunkt bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe und sind hilfreich zum Verständnis der interindividuellen Variabilität der Arzneimittelwirkung oder auch unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Zu den bekannten Nebenwirkungen von Tigecyclin gehören neben den sehr häufig (bei mindestens 10% der Patienten) auftretenden, wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall, auch häufig (bei 1% bis 10% der Patienten) vorkommende Nebenwirkungen, wie Schwindel, Kopfschmerzen, Erhöhung der Amylase, Anstieg des Blut-Harnstoff-Stickstoff-Wertes und der Leberwerte (ASAT und ALAT), Hyperbilirubinämie mit Pruritus und Hautausschlägen, Senkung des Blutzucker- und des Proteinspiegels im Serum, Veränderung der Gerinnung mit Verlängerung von aPTT und PT und das Vorkommen von Abszessen, Infektionen, Pneumonien und Sepsis. Gelegentlich (bei 0,1% bis 1% der Patienten) wird das Auftreten von Ikterus, akuter Pankreatitis, Thrombophlebitis, Thrombozytopenie mit Erhöhung des INR-Wertes und Entzündungen an der Injektionsstelle beobachtet. Hyperfibrinogenämie, Anaphylaxie, schwere Hautreaktionen bis hin zum Steven-Johnson-Syndrom und Leberinsuffizienz mit tödlichem Ausgang treten anhand der zur Verfügung stehenden Daten mit einer unbekannten Häufigkeit auf. Eine bedeutende Rolle für die Entstehung von unerwünschten Nebenwirkungen oder das Nichtwirken eines Medikamentes spielt die Bindung an Plasmaproteine oder Verteilung in tiefe Körperkompartimente. Sie

beeinflusst die Halbwertszeit eines Medikamentes und liegt bei Tigecyclin zwischen 71% bis 89%. Im gebundenen Zustand wird die Substanz nicht verstoffwechselt und entzieht sich auch den Prozessen des Arzneistofftransports und somit der biliären und renalen Elimination. Nur durch Erhöhung der Dosis kann eine Proteinsättigung erreicht werden und damit mehr freie, wirksame Substanz zur Verfügung gestellt werden [41].

Das in dieser Arbeit näher untersuchte Antibiotikum der Familie der Glycylcycline namens Tigecyclin wird primär unverändert zu 59% biliär ausgeschieden und zu weiteren 33% renal über den Urin [41]. Da die Substanz bei physiologischem pH-Wert ($\text{pH} = 7,35 - 7,45$) annähernd zu 100% in ionisierter Form vorliegt (Berechnung auf Grundlage der Henderson-Hasselbalch-Gleichung: $\text{pH} = \text{pK}_s + \lg \frac{[\text{Base}]}{[\text{Säure}]}$ und den bekannten physikochemischen Eigenschaften der Substanz: pK_s -Wert: 0,25/ 8,76), ist davon auszugehen, dass der membranale Transport nicht primär über passive Diffusion erfolgt, sondern der Arzneistoff über entsprechende Transportproteine vom Blut in die Hepatozyten bzw. proximalen Tubuluszellen aufgenommen wird und von dort aus in die Galle bzw. den Urin sezerniert wird [14]. Im Institut für Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald standen für die SLCO-Transporter OATP1B1, -1B3 und -2B1 sowie für den SLC-Transporter NTCP stabil transfizierte HEK293-Zellen und für die ABC-Transporter MRP2 und MRP3 *inside-out*-Vesikel zur Verfügung. Die aufgeführten Transporter der SLC- und SLCO-Familie werden unter anderem an der basolateralen, d.h. an der dem Blut zugewandten Seite, der Hepatozyten exprimiert. Der Effluxtransporter MRP2 befindet sich sowohl im proximalen Tubulussystem der Niere als auch am Übergang zwischen Hepatozyten und Gallenwegen in der apikalen Membran. Die Effluxpumpe MRP3 ist dagegen an der sinusoidalen Seite der Hepatozyten, die dem Blut zugewandt ist, lokalisiert [16, 41].

In den durchgeführten Kompetitionsassays konnte gezeigt werden, dass Tigecyclin einen inhibitorischen Einfluss auf den Transport von bekannten Standardsubstraten von OATP1B3-, OATP2B1-, MRP2- und MRP3-Transportern besitzt. Dies zeigt einerseits ein mögliches Interaktionspotential mit anderen Substraten an und suggeriert zudem, dass Tigecyclin möglicherweise selbst ein Substrat dieser Transporter ist. Bei den direkten

Aufnahmeversuchen, die anschließend mittels LC-MS/MS analysiert wurden, konnte jedoch nur eine Affinität von Tigecyclin zu OATP2B1 verifiziert werden. Ein möglicher Transportmechanismus von Tigecyclin aus dem Blutsystem in die Hepatozyten kann somit also über den OATP2B1-Transporter angenommen werden. Da für diesen Transporter auch potentiell funktionell relevante genetische Polymorphismen beschrieben wurden, ließen sich damit möglicherweise interindividuelle Variabilität bezüglich der Kinetik und der erwähnten Lebertoxizität erklären [41, 57]. Zudem sind OATP2B1-Transportproteine in der menschlichen Plazenta und Brustdrüse lokalisiert, was die bekannten unerwünschten Wirkungen bei Einnahme von Tigecyclin während der Schwangerschaft und Stillzeit (Zahnschäden wie Verfärbung und Verlust des Zahnschmelzes und Verzögerung der Knochenbildung) erklären würde [17, 28, 41]. Ein Nachweis, dass Tigecyclin ein Substrat von OATP1B1-, OATP1B3-, NTCP-, MRP2- und MRP3-Transportern ist, gelang jedoch nicht. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass aufgrund methodischer Schwierigkeiten und der begrenzten Arbeitszeit die Aufnahmeversuche mittels MRP2- und MRP3-Vesikeln nicht mehr ausreichend oft durchgeführt werden konnten, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Insbesondere für die Effluxtransporter MRP2/3 konnten keine direkten Aufnahmeversuche durchgeführt werden.

Es ist davon auszugehen, dass Tigecyclin im menschlichen Körper zusätzlich auch über andere Transportsysteme befördert wird, wie z.B. dem ABC-Transporter P-gp. Da sowohl der P-gp-Inhibitor (z.B. Ketoconazol) als auch der etablierte Induktor (z.B. Rifampicin) in P-gp-überexprimierenden Zellmodellen einen erheblichen Einfluss auf den Tigecyclintransport hatte, ist anzunehmen, dass der Arzneistoff ein P-gp-Substrat ist und dem Transporter eine entsprechende Relevanz in der Pharmakokinetik der Substanz zukommt [41]. Obwohl die zeitgleiche Einnahme von Tigecyclin und dem P-gp-Substrat Digoxin keine gegenseitigen Auswirkungen auf die Pharmakokinetik und Clearance zeigte, neigt Tigecyclin jedoch zu Interaktionen bei gleichzeitiger Gabe mit anderen P-gp-Substraten bezüglich der hepatischen Aufnahme und Exkretion [41, 64]. Dies zeigt sich z.B. bei Kombination von Tigecyclin mit Ciclosporin in einer erhöhten Bioverfügbarkeit des Immunsuppressivums [53]. Möglicherweise hemmt Tigecyclin den P-gp-vermittelten intestinalen und / oder biliären Efflux von Ciclosporin [53]. Da Ciclosporin auch ein bekannter

Inhibitor von OATP2B1 ist, müsste die Ausscheidung von Tigecyclin in der genannten Kombination theoretisch gehemmt werden [15, 25]. Dies ist jedoch nicht der Fall und weist darauf hin, dass potentiell noch andere hepatische Transportmechanismen für Tigecyclin existieren.

Vergleichbare Verbindungen zum Glycylcyclin Tigecyclin sind Tetracycline, wie Minocyclin und Doxycyclin. Sie gehören ebenfalls zur Gruppe der Breitspektrumantibiotika und verursachen zum Teil gleiche unerwünschte Nebenwirkungen (z.B. Verfärbung der Zähne, Pankreatitis, Photosensibilität) wie Tigecyclin [41, 44]. Auch Tetracycline werden biliär und renal ausgeschieden und sind daher bei Leber- und Niereninsuffizienz nur begrenzt einsetzbar [1, 44]. Auch die kombinierte Einnahme von Doxycyclin mit Ciclosporin führt zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Immunsuppressivums [1]. Tetracycline sind zudem als OATP2B1-Inhibitoren beschrieben [26] und werden unter anderem über *human organic anion transporter* (hOAT) transportiert [6]. Eine kombinierte Einnahme eines Tetracyclins oder anderen OATP-Hemmstoffen mit Tigecyclin könnte somit durch Hemmung von hepatischem OATP2B1 möglicherweise zu einer Akkumulation von Tigecyclin im Blut durch verminderte Ausscheidung führen und damit ein verstärktes Auftreten von Nebenwirkungen, wie Leberschäden mit cholestatischem Verlauf und Leberinsuffizienz mit tödlichem Ausgang, induzieren [41]. Da allerdings die Auswirkungen von Cholestase auf die Pharmakokinetik von Tigecyclin nicht ausreichend untersucht ist, wird aufgrund der überwiegend biliären Ausscheidung des Antibiotikums, eine enge Überwachung von Laborparametern, wie Leber- (ASAT, ALAT) und Nierenwerten, Amylase, Lipase und Gerinnungsparametern, vor und während der Therapie angeraten [41].

Durch die kompetitiv hemmende Wirkung von Tigecyclin auf OATP1B3-, OATP2B1-, MRP2- und MRP3-Transporter kann das Antibiotikum mit anderen Substraten der genannten Transporter in Interaktion treten, was potentiell ein vermehrtes Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen zur Folge hat. Bekannt ist bereits, dass die Kombination von Ciclosporin (ebenfalls Inhibitor von OATP1B3 und -2B1) mit Statinen (Eliminierung unter anderem über OATP1B3- und OATP2B1-Transporter) eine Erhöhung des Plasmaspiegels von Statinen zeigt und damit das Myopathierisiko erhöht [3, 15, 16, 46].

Ähnliches wäre daher bei kombinierter Einnahme von Tigecyclin mit Statinen auch zu erwarten. Eine Dosisreduktion bzw. eine klinische Überwachung der Wirksamkeit und entsprechender Laborparameter (z.B: Anstieg der muskelspezifischen Kreatinkinase bei Myopathie) wären daher anzuraten [45]. Ein denkbare Beispiel für die Interaktion zwischen Tigecyclin mit einem bekannten MRP2- und MRP3-Substrat wäre Methotrexat [16]. Da MRP2 für die biliäre Exkretion von Methotrexat relevant ist, könnte die potentielle Inhibition des Efflux-Transporters durch Tigecyclin zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von Methotrexat führen und demzufolge das Auftreten von schweren toxischen Nebenwirkungen des Immunsuppressivums, wie beispielsweise Knochenmarkdepression, provozieren [42, 61].

Es sind bisher keine Interaktionen zwischen Tigecyclin und CYP-450-Isoenzymen (1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4) bekannt. Weder die Clearance von Tigecyclin wird durch CYP-Isoenzymen gehemmt oder induziert, noch ist Tigecyclin ein Hemmstoff dieser. Auch die kombinierte Einnahme mit Warfarin (Metabolisierung über CYP2C9) beeinflusst die Pharmakokinetik von Tigecyclin nicht [40, 65].

Der analytische Nachweis von Tigecyclin mittels LC-MS/MS-Methode, der nach den Aufnahmeversuchen von Tigecyclin in Transporter-transfizierte HEK293-Zellen bzw. mit MRP2- und MRP3-Vesikeln durchgeführt wurde, gestaltete sich hierbei schwierig. Beispielsweise lagen die Arzneistoffkonzentrationen häufig unterhalb der Bestimmungsgrenze des Verfahrens. Um auszuschließen, dass die genannten Schwierigkeiten nicht durch mögliche Stabilitätsprobleme oder unzureichende Löslichkeit von Tigecyclin verursacht wurden, erfolgte eine Analyse von Tigecyclinproben, die in verschiedenen Lösungsmitteln verflüssigt und bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert wurden. Diese Versuche sollten dabei helfen, eine vollständige Lösung des Arzneistoffes zu erzielen, ein möglichst günstiges Milieu für das Antibiotikum zu finden, somit dessen Stabilität zu bewahren und damit optimale Versuchsergebnisse zu erlangen.

Tigecyclin liegt in fester Form als Pulver vor und sollte bei unter 25 °C gelagert werden. Für den klinischen Gebrauch wird das Antibiotikum in 0,9%iger Kochsalzlösung, 5%iger Dextroselösung oder Ringer-Laktat-Lösung gelöst. Entfällt die Indikation zur *in vivo*-Anwendung, muss bereits zubereitete Lösung

verworfen werden, da Luft, Licht und mechanische Beeinflussung zu Stabilitätseinbußen führen können [23, 41, 51, 62].

Bei den Stabilitätsuntersuchungen zeigte sich, dass Tigecyclin gelöst in destilliertem Wasser oder Inkubationspuffer stabiler ist als in 0,9%iger Kochsalzlösung. Wasser ist als Lösungsmittel für die Transportversuche an HEK293-Zellen wiederum ungeeignet. Aufgrund der Neigung, einen Konzentrationsausgleich im Sinne der Osmose zwischen intra- und extrazellulärem Raum zu schaffen, wirkt Wasser zytotoxisch, da es zum Platzen der Zellen führt. Für die Transportversuche wurde daher Inkubationspuffer als geeignetes Lösungsmittel für Tigecyclin verwendet.

Bei den Untersuchungen zur Stabilität konnte außerdem gezeigt werden, dass die Lagerung der wässrigen Arbeitslösungen (Tigecyclin gelöst in Inkubationspuffer) bei 4 °C zu Stabilitätseinbußen um bis zu 70,3% im Vergleich zu frisch angesetzten Proben führt. Diese Stabilitätseinbußen der verwendeten Lösungen, welche in der Regel für ein bis zwei Tage bei zum Teil 4 °C gelagert wurden, können eine Erklärung für im Endeffekt zu geringe Endkonzentrationen in den Aufnahme- oder Kompetitionsmessungen sein. Bei zukünftigen Untersuchungen wäre demnach zwingend auf eine strikte Lagerung der Stamm- und Arbeitslösungen, sowie der Messproben bei -80 °C zu achten.

Die Instabilität von Tigecyclin wird zum einen durch eine Phenolgruppe begründet, die bei einem pH-Wert ab 7 vermehrt oxidiert wird. Zum anderen ist Tigecyclin bei niedrigeren pH-Werten anfällig für nicht-enzymatische Epimerisierung. Unter Epimerisierung versteht man eine Konfigurationsumkehr an einem asymmetrischen Kohlenstoffatom eines Moleküls, das mehrere asymmetrische Kohlenstoffatome aufweist. Durch beide genannten Veränderungen am Molekül wird die Substanz inaktiviert. Das unter dem Namen Tygacil® erhältliche Tigecyclin beinhaltet jedoch Hilfsstoffe, die diese zwei Prozesse verhindern sollen. Neben Laktose Monohydrat, welches die Epimerisierung verhindert, werden Salzsäure bzw. Natriumhydroxid verwendet, um den pH-Wert einzustellen und somit einer Oxidation entgegenzuwirken [23].

Eine Möglichkeit, das Antibiotikum möglichst stabil in Lösung zu halten, bietet die Zugabe des Antioxidans Ascorbinsäure, die in Lösung einen sauren pH-

Wert besitzt. Ascorbinsäure ist ein wasserlösliches Reduktionsmittel und verhindert, dass andere in Lösung befindliche Substanzen oxidiert werden und damit zerfallen. Durch Hinzufügen von Ascorbinsäure konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die Stabilität und damit auch die Haltbarkeit von Tigecyclin in gelöstem Zustand sogar bei Raumtemperatur verlängert werden können [20, 23].

Ein ganz anderer Ansatzpunkt für die Erklärung, warum Tigecyclin zum Teil nur geringfügig nachweisbar war, könnten die verwendeten rekombinanten HEK293-Zellen und die Membranvesikel selbst sein. Obwohl diese nützlich sind, um Arzneimittelwirkungen zu untersuchen, können sie auch gewisse Schwierigkeiten und Einschränkungen bei der Anwendung mit Aufnahme- und Effluxtransportern mit sich bringen. Rekombinante Zelllinien, die Aufnahmetransporter wie OATP- und NTCP-Transporter exprimieren, besitzen zwar eine relativ geringe Komplexität, sind aber bei der Herstellung und Charakterisierung sehr zeitintensiv. Zudem kann deren Transporterexpressionsrate von Labor zu Labor variieren und die eigentliche Informationserfassung der Transportfunktion der transfizierten Transporter von eventuellen endogenen Transportaktivitäten der Wirtszelle erschweren [7, 30]. Das Gleiche gilt auch für Membranvesikel. Es ist nicht auszuschließen, dass noch andere Transportproteine vorhanden sind, die das Antibiotikum z.B. wieder nach extrazellulär befördern. Membranvesikel zeigen einen hohen Transporter-Expressionsgrad in rekombinanten Systemen, sind gut geeignet für Substanzen mit geringer Permeabilität und lassen sich von zytotoxischen Verbindungen nicht beeinflussen. Dennoch sind sie in der Anwendung etwas komplizierter und erfordern umfangreichere Ausrüstung, wie z.B. eine Ultrazentrifuge. [10].

Zusammenfassend konnten mit dieser Arbeit die Erkenntnisse über den Transport von Tigecyclin in der Leber erweitert werden. Festgestellt worden ist, dass Tigecyclin Einfluss auf den Transport von bekannten Standardsubstraten bei OATP1B3-, OATP2B1-, MRP2- und MRP3-Transportern hat und somit möglicherweise in Kombination mit gleichzeitig applizierten Substraten dieser Transporter zu klinisch relevanten Interaktionen führen könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Tigecyclin selbst ein Substrat von OATP2B1 ist und möglicherweise der relevante Transporter für

die hepatische Aufnahme des Antibiotikums ist. Wie das Antibiotikum anschließend in die Gallenwege oder zurück in das Blutgefäßsystem gelangt, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Kompetitionsversuche deuten auf eine Beteiligung von MRP2/3 hin. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob Tigecyclin tatsächlich ein Substrat von MRP2 und / oder MRP3 ist.

6. Zusammenfassung

Transportproteine spielen für viele Arzneistoffe eine bedeutende Rolle bei der Absorption, Verteilung und Elimination und können folglich auch maßgeblich über die Anflutung eines Wirkstoffs am Ort der Wirkung und / oder Nebenwirkung(en) entscheiden. Ziel dieser Arbeit war es, die Affinität von Tigecyclin zu hepatischen Aufnahme- und Effluxtransportern zu bestimmen. Aus pharmakokinetischen Studien war bekannt, dass das Glycylcyclin hauptsächlich hepatisch ausgeschieden wird, wobei die zugrundeliegenden molekularen Transportmechanismen unbekannt waren, d.h. wie Tigecyclin von den Hepatozyten aufgenommen wird und wieder in die Galle bzw. in das Blut abgegeben wird. Die physikochemischen Eigenschaften der Substanz (logP-Wert: 0,8; pK_s-Wert: 0,25/ 8,76) sprechen gegen eine rein passive Diffusion über biologische Membranen.

Um den hepatozellulären Aufnahmetransport aufzuklären, wurden Wettbewerbsversuche und direkte Aufnahmeversuche mit Hilfe von stabil transfizierten HEK293-Zellmodellen, die Transportproteine der SLC- und SLCO-Familie stabil überexprimieren, durchgeführt. Unter Verwendung von *inside-out*-Vesikeln wurde der Effluxtransport von Tigecyclin über MRP2- und MRP3-Transporter untersucht. Um sicher zu gehen, dass die Zellmodelle funktionstüchtig sind, wurde deren Funktionalität vor jedem Versuch mittels bekannter Standardsubstrate und Standardinhibitoren bestätigt. Die direkten Aufnahmeversuche wurden mittels LC-MS/MS analysiert.

Tigecyclin zeigte im verwendeten Konzentrationsbereich und den angewendeten Inkubationszeiten keine zytotoxische Wirkung auf die Versuchszellen. Mit den Wettbewerbsassays konnte nachgewiesen werden, dass Tigecyclin einen hemmenden Einfluss auf den Transport von bekannten OATP1B3- und OATP2B1-Referenzsubstraten hat, jedoch keine Beeinflussung von OATP1B1 und NTCP zeigte. Des Weiteren konnte in direkten Aufnahmeversuchen gezeigt werden, dass Tigecyclin ein Substrat des ubiquitär exprimierten Transporters OATP2B1 ist. Ein signifikanter Nachweis, dass Tigecyclin ein Substrat von OATP1B1-, OATP1B3- und NTCP-Transportern ist, gelang jedoch nicht.

Im Bezug auf Effluxtransporter konnte eine Konkurrenz von Tigecyclin mit dem MRP2- und MRP3-vermittelten Transport in *inside-out*-Vesikeln

nachgewiesen werden. Ein direkter Transport von Tigecyclin über die Vesikel ließ sich jedoch nicht beweisen. Aufgrund methodischer Schwierigkeiten und der sehr begrenzten Bearbeitungszeit, konnten die Versuche nicht oft genug durchgeführt und keine entsprechend belastbaren Daten generiert werden. Zusammenfassend kann aus den durchgeführten Untersuchungen abgeleitet werden, dass Tigecyclin ein Substrat von OATP2B1 ist und OATP2B1 somit möglicherweise für die hepatische Aufnahme des Arzneistoffes verantwortlich ist. Ob noch andere Transporter eine Rolle spielen, bleibt weiterhin unbekannt. Auch die konkrete Transportkinetik mit der Affinität (K_m) und der Transportkapazität (v_{max}), bleibt nach diesen Versuchen noch unklar. Des Weiteren legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass bei gleichzeitiger Tigecyclin-Gabe ein gewisses Risiko für unerwünschte pharmakokinetische Interaktionen mit Substraten der Transporter OATP1B3, OATP2B1, MRP2 und MRP3 besteht.

Als Fazit kann gesagt werden, dass mit dieser Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung des Arzneimitteltransports und der Transporteigenschaften von Tigecyclin in den Hepatozyten geleistet werden konnte. Zusätzlich konnten weitere Erkenntnisse zur Competition gewonnen werden. In wie weit die *in vitro* Resultate auf *in vivo* Mechanismen übertragbar sind, ist unklar und bietet Möglichkeiten für weiterführende Untersuchungen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] 1 A Pharma GmbH. 2016. Fachinformation Doxycyclin 100. http://www.1a-files.de/pdf/fi/2016_12_doxycyclin1a_tbl_100_200mg_fi.pdf.
- [2] Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S. 2003. *Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli*. *Science* (New York, N.Y.) 301, 5633, 610–615.
- [3] Accord Healthcare Limite. 2017. Fachinformation Rosuvastatin Accord 5 mg/10 mg/20 mg/40mg Filmtabletten. https://accord-healthcare.de/fileadmin/user_upload/Produkte/fachinformationen/FI_Rosuvastatin_Stand_201706_bhso.pdf.
- [4] Amboss Miamed. 2018. Diagnostischer Test und Hypothesentestung. <https://amboss.miamed.de/library>.
- [5] American Chemical Society. 2013. *SciFinder*® CAS Registry Number: 220620-09-7. https://www.acs.org/content/acs/en.html?_ga=2.265504844.254169023.1497168594-1998724738.1497168594.
- [6] Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S. H., Sekine, T., Sakthisekaran, D., and Endou, H. 2002. *Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline*. *Japanese journal of pharmacology* 88, 1, 69–76.
- [7] Bentz, J., O'Connor, M. P., Bednarczyk, D., Coleman, J., Lee, C., Palm, J., Pak, Y. A., Perloff, E. S., Reyner, E., Balimane, P., Brännström, M., Chu, X., Funk, C., Guo, A., Hanna, I., Herédi-Szabó, K., Hillgren, K., Li, L., Hollnack-Pusch, E., Jamei, M., Lin, X., Mason, A. K., Neuhoﬀ, S., Patel, A., Podila, L., Plise, E., Rajaraman, G., Salphati, L., Sands, E., Taub, M. E., Taur, J.-S., Weitz, D., Wortelboer, H. M., Xia, C. Q., Xiao, G., Yabut, J., Yamagata, T., Zhang, L., and Ellens, H. 2013. *Variability in P-glycoprotein inhibitory potency (IC₅₀) using various in vitro experimental systems: implications for universal digoxin drug-drug interaction risk assessment decision criteria*. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 41, 7, 1347–1366.
- [8] Bexten, M., Oswald, S., Grube, M., Jia, J., Graf, T., Zimmermann, U., Rodewald, K., Zolk, O., Schwantes, U., Siegmund, W., and Keiser, M. 2015. *Expression of drug transporters and drug metabolizing enzymes in*

the bladder urothelium in man and affinity of the bladder spasmolytic trospium chloride to transporters likely involved in its pharmacokinetics. Molecular pharmaceutics 12, 1, 171–178.

- [9] Borra, R. C., Lotufo, M. A., Gaglioti, S. M., Barros, Fabiana de Mesquita, and Andrade, P. M. 2009. *A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. Brazilian oral research* 23, 3, 255–262.
- [10] Brouwer, K L R, Keppler, D., Hoffmaster, K. A., Bow, D A J, Cheng, Y., Lai, Y., Palm, J. E., Stieger, B., and Evers, R. 2013. *In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. Clinical pharmacology and therapeutics* 94, 1, 95–112.
- [11] Christel Weiß. 2013. Basiswissen Medizinische Statistik. F-Verteilung Seite 143, Streuungsparameter Seite 108. Springer.
- [12] D'Avolio, A., Peila, E., Simiele, M., Pensi, D., Baietto, L., Cusato, J., Cinnirella, G., Rosa, F. de, and Di Perri, G. 2013. *Ultra performance liquid chromatography PDA method for determination of tigecycline in human plasma. Therapeutic drug monitoring* 35, 6, 853–858.
- [13] Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. 2001. *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Journal of lipid research* 42, 7, 1007–1017.
- [14] Drugbank. 2005. *Tigecycline - Properties*. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00560>.
- [15] Estudante, M., Morais, J. G., Soveral, G., and Benet, L. Z. 2013. *Intestinal drug transporters: an overview. Advanced drug delivery reviews* 65, 10, 1340–1356.
- [16] Giacomini, K. M., Huang, S.-M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, Kim L R, Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczyński, M. J., and Zhang, L. 2010. *Membrane transporters in drug development. Nature reviews. Drug discovery* 9, 3, 215–236.
- [17] Grube, M., Köck, K., Karner, S., Reuther, S., Ritter, C. A., Jedlitschky, G., and Kroemer, H. K. 2006. *Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. Molecular pharmacology* 70, 5, 1735–1741.

- [18] Hagenbuch, B. and Stieger, B. 2013. *The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. Molecular aspects of medicine* 34, 2-3, 396–412.
- [19] Jacobson, B. S. and Branton, D. 1977. *Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. Science (New York, N.Y.)* 195, 4275, 302–304.
- [20] Ji, A. J., Saunders, J. P., Amorusi, P., Wadgaonkar, N. D., O'Leary, K., Leal, M., Dukart, G., Marshall, B., and Fluhler, E. N. 2008. *A sensitive human bone assay for quantitation of tigecycline using LC/MS/MS. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 48, 3, 866–875.
- [21] Ji, A. J., Saunders, J. P., Wadgaonkar, N. D., Petersen, P. J., O'Leary, K., McWilliams, W. E., Amorusi, P., Leal, M., and Fluhler, E. N. 2007. *A novel antibiotic bone assay by liquid chromatography/tandem mass spectrometry for quantitation of tigecycline in rat bone. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 44, 4, 970–979.
- [22] Jia, J., Puls, D., Oswald, S., Jedlitschky, G., Kühn, J. P., Weitschies, W., Hosten, N., Siegmund, W., and Keiser, M. 2014. *Characterization of the intestinal and hepatic uptake/efflux transport of the magnetic resonance imaging contrast agent gadolinium-ethoxylbenzyl-diethylenetriamine-pentaacetic acid. Investigative radiology* 49, 2, 78–86.
- [23] Jitkova, Y., Gronda, M., Hurren, R., Wang, X., Goard, C. A., Jhas, B., and Schimmer, A. D. 2014. *A novel formulation of tigecycline has enhanced stability and sustained antibacterial and antileukemic activity. PloS one* 9, 5, e95281.
- [24] Jung, D., Hagenbuch, B., Gresh, L., Pontoglio, M., Meier, P. J., and Kullak-Ublick, G. A. 2001. *Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. The Journal of biological chemistry* 276, 40, 37206–37214.
- [25] Kalliokoski, A. and Niemi, M. 2009. *Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. British journal of pharmacology* 158, 3, 693–705.
- [26] Karlgren, M., Vildhede, A., Norinder, U., Wisniewski, J. R., Kimoto, E., Lai, Y., Haglund, U., and Artursson, P. 2012. *Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of*

- protein expression on drug-drug interactions. Journal of medicinal chemistry* 55, 10, 4740–4763.
- [27] Kaya, M., Şimşek-Kaya, G., Gürsan, N., Kireççi, E., Dayi, E., and Gündoğdu, B. 2012. *Local treatment of chronic osteomyelitis with surgical debridement and tigecycline-impregnated calcium hydroxyapatite: an experimental study. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 113, 3, 340–347.
- [28] Knauer, M. J., Girdwood, A. J., Kim, R. B., and Tirona, R. G. 2013. *Transport function and transcriptional regulation of a liver-enriched human organic anion transporting polypeptide 2B1 transcriptional start site variant. Molecular pharmacology* 83, 6, 1218–1228.
- [29] Kounnis, V., Ioachim, E., Svoboda, M., Tzakos, A., Sainis, I., Thalhammer, T., Steiner, G., and Briasoulis, E. 2011. *Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B3, 1B1, and 1A2 in human pancreatic cancer reveals a new class of potential therapeutic targets. OncoTargets and therapy* 4, 27–32.
- [30] Kuteykin-Teplyakov, K., Luna-Tortós, C., Ambroziak, K., and Löscher, W. 2010. *Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. British journal of pharmacology* 160, 6, 1453–1463.
- [31] Lee, W., Belkhir, A., Lockhart, A. C., Merchant, N., Glaeser, H., Harris, E. I., Washington, M. K., Brunt, E. M., Zaika, A., Kim, R. B., and El-Rifai, W. 2008. *Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer. Cancer research* 68, 24, 10315–10323.
- [32] Leonhardt, M., Keiser, M., Oswald, S., Kühn, J., Jia, J., Grube, M., Kroemer, H. K., Siegmund, W., and Weitschies, W. 2010. *Hepatic uptake of the magnetic resonance imaging contrast agent Gd-EOB-DTPA: role of human organic anion transporters. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 38, 7, 1024–1028.
- [33] Li, C., Sutherland, C. A., Nightingale, C. H., and Nicolau, D. P. 2004. *Quantitation of tigecycline, a novel glycylcycline [corrected] by liquid chromatography. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 811, 2, 225–229.

- [34] Mandery, K., Bujok, K., Schmidt, I., Keiser, M., Siegmund, W., Balk, B., König, J., Fromm, M. F., and Glaeser, H. 2010. *Influence of the flavonoids apigenin, kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1*. *Biochemical pharmacology* 80, 11, 1746–1753.
- [35] Mazia, D., Schatten, G., and Sale, W. 1975. *Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy*. *The Journal of cell biology* 66, 1, 198–200.
- [36] Meyer Zu Schwabedissen, Henriette E, Boettcher, K., Steiner, T., Schwarz, U. I., Keiser, M., Kroemer, H. K., and Siegmund, W. 2014. *OATP1B3 is expressed in pancreatic β -islet cells and enhances the insulinotropic effect of the sulfonylurea derivative glibenclamide*. *Diabetes* 63, 2, 775–784.
- [37] Patterson, R. A. and Stankewicz, H. A. 2017. *Penicillin, Allergy*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=penicillin+alexander+flemming>.
- [38] Paulusma, C. C., Kool, M., Bosma, P. J., Scheffer, G. L., ter Borg, F., Scheper, R. J., Tytgat, G. N., Borst, P., Baas, F., and Oude Elferink, R P. 1997. *A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome*. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25, 6, 1539–1542.
- [39] Peterson, L. R. 2008. *A review of tigecycline--the first glycylcycline*. *International journal of antimicrobial agents* 32 Suppl 4, S215-22.
- [40] PFIZER PHARMA GmbH. 2013. Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC) Tygacil®.
- [41] PFIZER PHARMA GmbH. 2016. Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC) Tygacil®.
- [42] PFIZER PHARMA GmbH. 2017. Methotrexat „Lederle“ Tabletten. https://www.pfizermed.de/fileadmin/produkt Datenbank/pdf/001333_freigabe.pdf.
- [43] Pubchem. *SID 134223549 - PubChem*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/134223549/>.
- [44] Rote Liste Service GmbH. 2013. Fachinformation Tetracyclin Wolff®250. https://www.dokteronline.com/pils/de/patient_information_leaflet-3420-tetracyclin-de.pdf-1426847102.pdf.
- [45] Rote Liste Service GmbH. 2015. Atorvastatin-ratiopharm® 10 mg Filmtabletten.

<http://www.ratiopharm.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=37255&g=-1&r=1894%2C1894&token=74d749c3ccadbd5d01859ea885596364329a2392>.

- [46] Rote Liste Service GmbH. 2016. Fachinformation Simvastatin-ratiopharm® 30 mg Filmtabletten. <http://www.ratiopharm.de/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=60813&g=-1&r=1894%2C1894&token=f29ee4a41b0a9d41c2bba5cfa7eeaac625e55d25>.
- [47] Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. 2012. *OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. British journal of pharmacology* 165, 5, 1260–1287.
- [48] Schmitt, D. M., O'Dee, D. M., Cowan, B. N., Birch, J. W.-M., Mazzella, L. K., Nau, G. J., and Horzempa, J. 2013. *The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against Francisella tularensis. Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 93.
- [49] Seithel, A., Eberl, S., Singer, K., Auge, D., Heinkele, G., Wolf, N. B., Dörje, F., Fromm, M. F., and König, J. 2007. *The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 5, 779–786.
- [50] Sigma-Aldrich. 2009. *Poly-D-lysine product information*.
- [51] Sigma-Aldrich / Merck. 2017. Tigecycline hydrate PZ0021. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/pz0021?lang=de®ion=DE>. Accessed 11 June 2017.
- [52] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. 1985. *Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry* 150, 1, 76–85.
- [53] Srinivas, N. R. 2009. *Tigecycline and cyclosporine interaction-an interesting case of biliary-excreted drug enhancing the oral bioavailability of cyclosporine. European journal of clinical pharmacology* 65, 5, 543–544.
- [54] Statistics How To. 2018. *ANOVA Test: Definition, Types, Examples*. <http://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/hypothesis-testing/anova/>.

- [55] Stieger, B. 2011. *The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation. Handbook of experimental pharmacology*, 201, 205–259.
- [56] Stumpf, A. N., Schmidt, C., Hiddemann, W., and Gerbitz, A. 2009. *High serum concentrations of cyclosporin related to administration of tigecycline. European journal of clinical pharmacology* 65, 1, 101–103.
- [57] Tamai, I. 2012. *Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. Advanced drug delivery reviews* 64, 6, 508–514.
- [58] Thomas, P. and Smart, T. G. 2005. *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of pharmacological and toxicological methods* 51, 3, 187–200.
- [59] van de Steeg, Evita, Stránecký, V., Hartmannová, H., Nosková, L., Hřebíček, M., Wagenaar, E., van Esch, A., de Waart, Dirk R, Oude Elferink, Ronald P J, Kenworthy, K. E., Sticová, E., al-Edreesi, M., Knisely, A. S., Kmoch, S., Jirsa, M., and Schinkel, A. H. 2012. *Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. The Journal of clinical investigation* 122, 2, 519–528.
- [60] van der Weide, J and Steijns, L. S. 1999. *Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology. Annals of clinical biochemistry* 36 (Pt 6), 722–729.
- [61] Vlaming, Maria L H, Pala, Z., van Esch, A., Wagenaar, E., van Tellingen, O., de Waart, Dirk R, Oude Elferink, Ronald P J, van de Wetering, Koen, and Schinkel, A. H. 2008. *Impact of Abcc2 (Mrp2) and Abcc3 (Mrp3) on the in vivo elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 24, 8152–8160.
- [62] Wright, Jane, Gray, Alistair, Bruce, Lynn, Goodey, Vincent. 2011. *Injectable Drugs Guide, Pharmaceutical Press*. 819–821.
- [63] Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Okada, M., Kobayashi, M., Unno, M., Abe, T., Goto, J., Hishinuma, T., Shimada, M., and Mano, N. 2011. *Screening of antibiotics that interact with organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 using fluorescent probes. Biological & pharmaceutical bulletin* 34, 3, 389–395.

- [64] Zimmerman, J. J., Harper, D. M., Matschke, K., Speth, J. L., Raible, D. G., and Fruncillo, R. J. 2007. *Absence of an interaction between tigecycline and digoxin in healthy men. Pharmacotherapy* 27, 6, 835–844.
- [65] Zimmerman, J. J., Raible, D. G., Harper, D. M., Matschke, K., and Speth, J. L. 2008. *Evaluation of a potential tigecycline-warfarin drug interaction. Pharmacotherapy* 28, 7, 895–905.

8. Anhang

8.1 Zellen und Vesikel

Zelle/ Vesikel	Hersteller
HEK293-OATP1B1	Institut für Pharmakologie Universität Greifswald, D.
HEK293-OATP1B3	Institut für Pharmakologie Universität Greifswald, D.
HEK293-OATP2B2	Institut für Pharmakologie Universität Greifswald, D.
HEK293-NTCP	Institut für Pharmakologie Universität Greifswald, D.
HEK293-pQCXIN	Institut für Pharmakologie Universität Greifswald, D.
Human MRP2-Vesikel	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Human MRP3-Vesikel	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark

8.2 Laborgeräte, Software und Verbrauchsmaterialien

8.2.1 Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage: CPA225D	Sartorius, Göttingen, D.
Bandelin Sonoplus UW 2070 (Ultraschall-Homogenisator)	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D.
Biometra® WT12 Taumelschüttler	Biometra GmbH, Göttingen, D.
CASY® 1 Model TT	Schäfer System GmbH, Reutlingen, D.
Dispensette	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.
Einlagerungstürme für Cryoboxen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D.
Eiswanne	neoLab, Heidelberg, D.
Eppendorf-Pipetten: Eppendorf Reference® (10/100/1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D.
Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, D.
Eppendorf Standard-Racks	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D.

Falcon-Racks	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D.
Flockeneisbereiter	Manitowoc, Wisconsin, USA
HD <i>Microscope Camera</i> Leica ICC50 HD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D.
Heizblock: <i>ThermoCell Mixing Block</i> MB-102	Bioer Technology Co., Hangzhou, China
Heraeus™ Multifuge™ X3 <i>Centrifuge</i> Series	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Inkubator Memmert BE 200	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D.
Inkubator Memmert HNE 200	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D.
Inkubator Memmert INC 246	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D.
Inkubator Midi 40 CO ₂	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Instrumentenschale	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D.
Kryoboxen	neoLab, Heidelberg, D.
Kryotec Labor-Tiefkälte-Lagerschrank	Kryosafe GmbH, Hamburg, D.
Leica DM IL LED Mikroskop	Leica Microsystems, Tuttlingen, D.
Magnetrührer: MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabenbach, D.
Mikrozentrifuge <i>MiniStar silverline</i>	VWR International GmbH, Darmstadt, D.
Millipore® XX2702550 Model 1225 <i>Sampling Manifold Vacuum Filtration Cell Harvester</i>	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D.
MVE 800 Series -190°C <i>High Efficiency Freezer</i>	Chart Industries, Cleveland, Ohio, USA
Nalgene™ Cryo 1 °C <i>Freezing Container</i>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Pipetboy Integra	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, D.
Plattenphotometer Tecan Infinite® M200	Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Privileg Öko Energiesparerer Kühlschrank	Privileg, Stuttgart, D.
Privileg Superöko Kühlschrank	Privileg, Stuttgart, D.

Rotilabo®-signal-timer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Seven Easy pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, D.
Standard Analog Shaker	VWR International GmbH, Darmstadt, D.
Sterilwerkbank: Herasafe™ KS / KSP <i>Biological Safety Cabinets</i>	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, D.
TC10™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.
Tiefkälte-Lagerschrank	Kryotec G.m.b.H. Hamburg, D.
Vakuumpumpe: KNF LAB LABPORT	KNF Neuberger, Freiberg, D.
Vakuumpumpe: Vacuubrand® CVC 3000	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, D.
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, D.
Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad Lauda Aqualine AL25	LAUDA Dr. R Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D.
Wasseraufbereiter MembraPure Astacus	MembraPure GmbH, Henningsdorf, D.

8.2.2 Software

Software	Hersteller
Excel 2007, 2010, 2013	Microsoft, Redmont, USA
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Tecan i-control 1.6	Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
Paint.NET v4.0.5	dotPDN LLC, USA
Leica Application Suite Mikroskop-Software	Leica Microsystems, Tuttlingen, D.
Wallac 1420 Manager 3.00 Software	Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finnland

8.2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BD Falcon™ 50 ml <i>Polypropylene Conical Tube</i>	BD Biosciences, Heidelberg, D.
BD Falcon™ <i>High Clarity Polypropylene Conical Tube</i> 15 ml	BD Biosciences, Heidelberg, D.
CRYO.S™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D.
<i>Combitips advanced</i> ®	Eppendorf AG, Hamburg, D.
Einmal-Kanülen Neoject® 21 × 1 1/2	Dispomed Witt cHG, Gelnhausen, D.
<i>Eppendorf Tubes</i> 0,5/1,5/2,0/5,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D.
epT.I.P.S. Standard Eppendorf Tips (10/200/1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D.
Membranfilter Millipore GSWPO2500	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, D.
<i>Multiwell</i> ™ 24 Well	BD Biosciences, Heidelberg, D.
<i>Multiwell</i> ™ 6 Well	BD Biosciences, Heidelberg, D.
NUNC® <i>MicroWell</i> ™ 96 well polystyrene plates	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Parafilm M® <i>Laboratory Film</i>	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D.
pH-Indikatorstäbchen nicht blutend Acilit pH 0-6	Merck KGaA, Darmstadt, D
Roth-Messflaschen Typ mini Vail C, LDPE (5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Roth-Messflaschen Typ mini Vail C, LDPE (20 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Rotilabo®-Spitzenfilter PVDF steril, Porengröße 0,45 µm, Ø 33 mm	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, D.
Serologische Pipetten (5/10/25 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D.
Spritzen BD Discardit™ II (2/10 ml)	Becton Dickinson Labware Europe, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Styroporgefäß	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D.
TC10™ <i>Counting Slides</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.

Universal- Indikatorpapier pH 1-14	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
VWR® <i>Disposable Glass Pasteur Pipets</i> 150 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, D.
Zellkulturschalen 100 × 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht, D.

8.3 Chemikalien, Kits, Medien und Puffer

8.3.1 Chemikalien und Kits

Chemikalien/ Kits	Hersteller
[³ H] Bromosulphophthalein ([³ H]BSP) 14 Ci/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D.
[³ H]- Estradiol-17β-Glukuronid ([³ H]-E-17β-Gln) 50 Ci/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D.
[³ H] Estron-3-Sulfat ([³ H]E ₁ S) 50 Ci/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D.
[³ H] Taurocholat ([³ H]TA) 4,6 Ci/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig, D.
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Aqua Clean Konzentrat (Zusatz für Heizbadflüssigkeiten)	LabAgents, Friedrichsdorf, D.
Bromosulphophthalein (BSP)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, D
CASY®ton, <i>ready to use Ceramus</i>	Innovates AG CASY®-Technology, Reutlinge, D.
Creatinkinase	LabAgents, Friedrichsdorf, D.
D(+)-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, D.
D(+)-Sucrose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Dulbecco's <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (DPBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Estradiol-17-(β -D-glucuronide) (E-17 β -Gln)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Estron-3-Sulfat (E ₁ S)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Ethanol 70%	Universitäts-Apotheke, Greifswald, D.
<i>Formic acid</i> Emsure® ACS 89 – 91%	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, D.
<i>Fetal Bovine Serum Gold</i> (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
G418	Invivogen, Karlsruhe, D.
HEPES Pufferan®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen, D.
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
<i>MEM with Earle's Salts without Glutamine</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
MK-571	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, D.
<i>Non Essential Amino Acids</i>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D.
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pierce BCA® Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Plasmocin™ Prophylactic, Plasmocin™ <i>Treatment</i>	Invivogen, Karlsruhe, D.

Poly-D-lysine hydrobromid	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Resazurin PrestoBlue™ <i>Cell Viability Reagent</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D.
Rifampicin	Honeywell Riedel-de Haën®, Seelze, D.
Rotiszint® eco plus LSC-Universal-cocktail (Szintillationsflüssigkeit)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Salzsäure 37%, rauchend	Merck KGaA, Darmstadt, D.
stabiles Glutamin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D.
Taurocholat	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Tigecycline hydrate ≥98% (HPLC)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Tris Pufferan®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
Triton X-100	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Wasser	hausintern, einfach- und bidestilliert

8.3.2 Medien, Puffer und weitere Lösungen

Einfriermedium - Zusammensetzung	Hersteller
90% <i>Fetal Bovine Serum Gold</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
10% Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.

Inkubationspuffer – Zusammensetzung	Hersteller
1,5 mM CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, D.
5 mM Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, D.
12,5 mM HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.

5 mM KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
1 mM KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
1,2 mM MgSO ₄ *7H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
142 mM NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
der pH = 7,3 wurde mit NaOH eingestellt	Merck KGaA, Darmstadt, D.

Lysis-Puffer – Zusammensetzung	Hersteller
0,5% Desoxycholat	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
50 mM NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
25 mM Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
0,5% Triton X-100	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
der pH = 8 wurde mit HCl eingestellt	Merck KGaA, Darmstadt, D.

Nährmedium für Transporterversuche mit HEK-Zellen - Zusammensetzung	Hersteller
<i>MEM with Earle´s Salts without Glutamine</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>10% Fetal Bovine Serum Gold</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>2 mM Non Essential Amino Acids</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>1% Penicillin / Streptomycin</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>2 mM stabiles Glutamin</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

PBS - Zusammensetzung	Hersteller
0,2 g/l KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
0,2 g/l KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
8 g/l NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
1,15 g/l Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.

Selektionsmedium für HEK-Zellen - Zusammensetzung	Hersteller
10% <i>Fetal Bovine Serum Gold</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
10 µl/ml G418 (Selektionsantibiotikum)	Invivogen, Karlsruhe, D.
<i>MEM with Earle's Salts without Glutamine</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
2 mM <i>Non Essential Amino Acids</i>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
1% Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
2 µl/ml Plasmocin Prophylactic oder 0,2 µl/ml Plasmocin Treatment (Selektionsantibiotika)	Invivogen, Karlsruhe, D.
2 mM stabiles Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Zusammensetzung der ATP bzw. AMP Lösungen	Hersteller
48,4 mM ATP (Natrium-Salz) bzw. 48,4 mM AMP (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
90 mM K ₂ CO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, D.
121 mM MgCl ₂ *6H ₂ O	Isocommerz, Herzberg, D.
121 mM Phosphorkreatin	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, D.
gelöst in Tris-Sucrose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.

der pH = 7,4 wurde mit HCl eingestellt	Merck KGaA, Darmstadt, D.
--	---------------------------

Tris-Sucrose	Hersteller
250 mM Sucrose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
10 mM Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D.
der pH = 7,4 wurde mit HCl eingestellt	Merck KGaA, Darmstadt, D.

8.4 Hepatische Aufnahme- und Effluxtransporter, die möglicherweise Tigecyclin transportieren

Tab. 8.1: Substrate und Inhibitoren für die hepatischen Aufnahmetransporter OATP1B1, -1B3, -2B1 und NTCP sowie die ABC-Transporter MRP2 und MRP3. [10, 15, 16]

Transporter	Substrate	Inhibitoren
OATP1B1 (<i>SLCO1B1</i>)	Atorvastatin Bilirubin Bromosulfophthalein Estradiol-17 β -Glucuronid Estron-3-Sulfat Gallensäure Leukotrien C ₄ , E ₄ Olmesartan Pitavastatin Prostaglandin E ₂ Rosuvastatin Thyroxin Triiodthyronin Valsartan	Bromosulfophthalein Cyclosporin A MK-571 Östropipat Rifampicin Ritonavir Saquinavir
OATP1B3 (<i>SLCO1B3</i>)	Bromosulfophthalein Cholecystokinin Octapeptid Digoxin Estradiol-17 β -Glucuronid Fexofenadin Gallensäure Glutathion	Bromosulfophthalein Cyclosporin A Lopinavir MK-571 Rifampicin Ritonavir Ursolsäure

	Leukotrien C ₄ Olmesartan Statine Telmisartan Thyroxin Triiodthyronin Valsartan	
OATP2B1 (<i>SLCO2B1</i>)	Aliskiren Atorvastatin Bromosulfophthalein Dihydroepiandrosteron Estron-3-Sulfat Pitavastatin Pravastatin Prostaglandin E ₂ Taurocholat Thyroxin	Bromosulfophthalein Budesonid Cyclosporin Everolimus Grapefruitsaft MK-571 Rifampin Sirolimus
NTCP (<i>SLC10A1</i>)	Gallensalze Schilddrüsenhormone sulfatierte Verbindungen	
MRP2 (<i>ABCC2</i>)	Carboxy-Dichlorofluorescein Dinitrophenyl-Glutathion Estradiol-17 β -Glucuronid Ethacrynyl Glutathione Etoposid Fluo 3-AM Methotrexat Mitoxantron Olmesartan Valsartan Vinblastin	Cyclosporin Delavirdin Efavirenz Emtricitabin Furosemid Grapefruitsaft Indomethacin Leukotriene C ₄ MK-571 Phenolphthalein Glucuronid Probenecid Valspodar (PSC833)
MRP3 (<i>ABCC3</i>)	Carboxy-Dichlorofluorescein Estradiol-17 β -Glucuronid Fexofenadin Methotrexat	MK-571 Delavirdin Efavirenz Emtricitabin Probenecid

8.5 Zusammensetzungen der Versuchslösungen und Pipettierschemata

8.5.1 Stammlösung Tigecyclin

Für die Versuche wurde eine 10 mM Stammlösung Tigecyclin in DMSO hergestellt. Da höhere Konzentrationen von DMSO eine toxische Wirkung auf die Zellen haben, soll deren Konzentration nur 1% betragen [10]. Um weitere Konzentrationen von Tigecyclin herzustellen, wurde das Antibiotikum weiter mit IP verdünnt. Das Molekulargewicht von Tigecyclin beträgt 585,65 g/l [5].

$$585,65 \text{ g/l} \triangleq 1 \text{ Mol} \triangleq 1000 \text{ mMol}$$

$$5,8565 \text{ g/l} \triangleq 10 \text{ mMol}$$

$$\frac{\text{Menge Tigecyclin [mg]}}{\text{Volumen DMSO [ml]}} = \frac{5,8565 \frac{\text{g}}{\text{l}}}{1000 \text{ ml}}$$

8.5.2 Transportversuche zur Überprüfung der Funktion von Transportproteinen

Die Ansätze der Inkubationslösungen für die Aufnahmeversuche der einzelnen Transporter inklusive der Kontrolle erfolgten als Triplikate. Der Ansatz für die Transporter OATP1B1 und OATP2B1 wurde in einem vorgenommen, da diese beiden Transporter gleiche Standardsubstrate und Standardinhibitoren besitzen. Auf 1 ml Inkubationspuffer werden 0,25 µl [³H]-E₁S, 0,25 µl [³H]-Taurocholat bzw. 0,14 µl [³H]-BSP gegeben.

Tab. 8.2: Ansätze für die Transportversuche zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine.

Zelllinien	Volumen IP	Volumen Substrat	Volumen [³ H]-markiertes Substrat
HEK-OATP1B1 HEK-OATP2B1	3300 µl	3,3 µl E ₁ S (1 mmol/l)	0,825 µl [³ H] E ₁ S (50 Ci/mmol)
HEK-OATP1B3	2100 µl	2,1 µl BSP (1 mmol/l)	0,294 µl [³ H] BSP (14 Ci/mmol)
HEK-NTCP	2100 µl	21 µl TA (1 mmol/l)	0,525 µl [³ H] TA (4,6 Ci/mmol)

Die Ansätze für die Inhibitorkontrollen bestanden aus einem Gemisch aus Inkubationspuffer mit $[H^3]$ -markiertem und $[H^3]$ -unmarkiertem Substrat entsprechend der einzelnen Transporter (s. Tab. 8.2) plus Zugabe des zugehörigen Inhibitors (s. Tab 8.3).

Tab. 8.3: Ansätze für die Inhibitorkontrollen der Transportversuche zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine.

Zelllinien	Volumen IPS	Volumen Inhibitor
HEK-OATP1B1 HEK-OATP2B1	1642 μ l	8,21 μ l Rifampicin (100 mmol/l)
HEK-OATP1B3	995 μ l	4,975 μ l Rifampicin (100 mmol/l)
HEK-NTCP	990 μ l	9,9 μ l BSP (50 mmol/l)

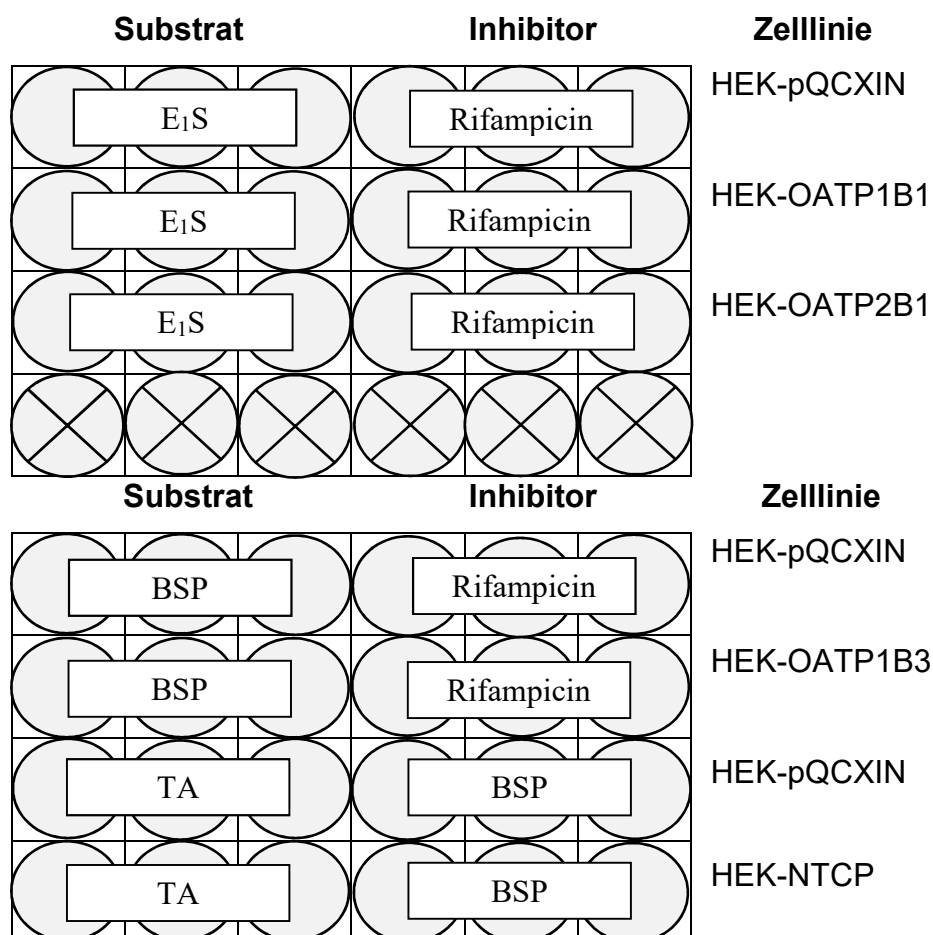
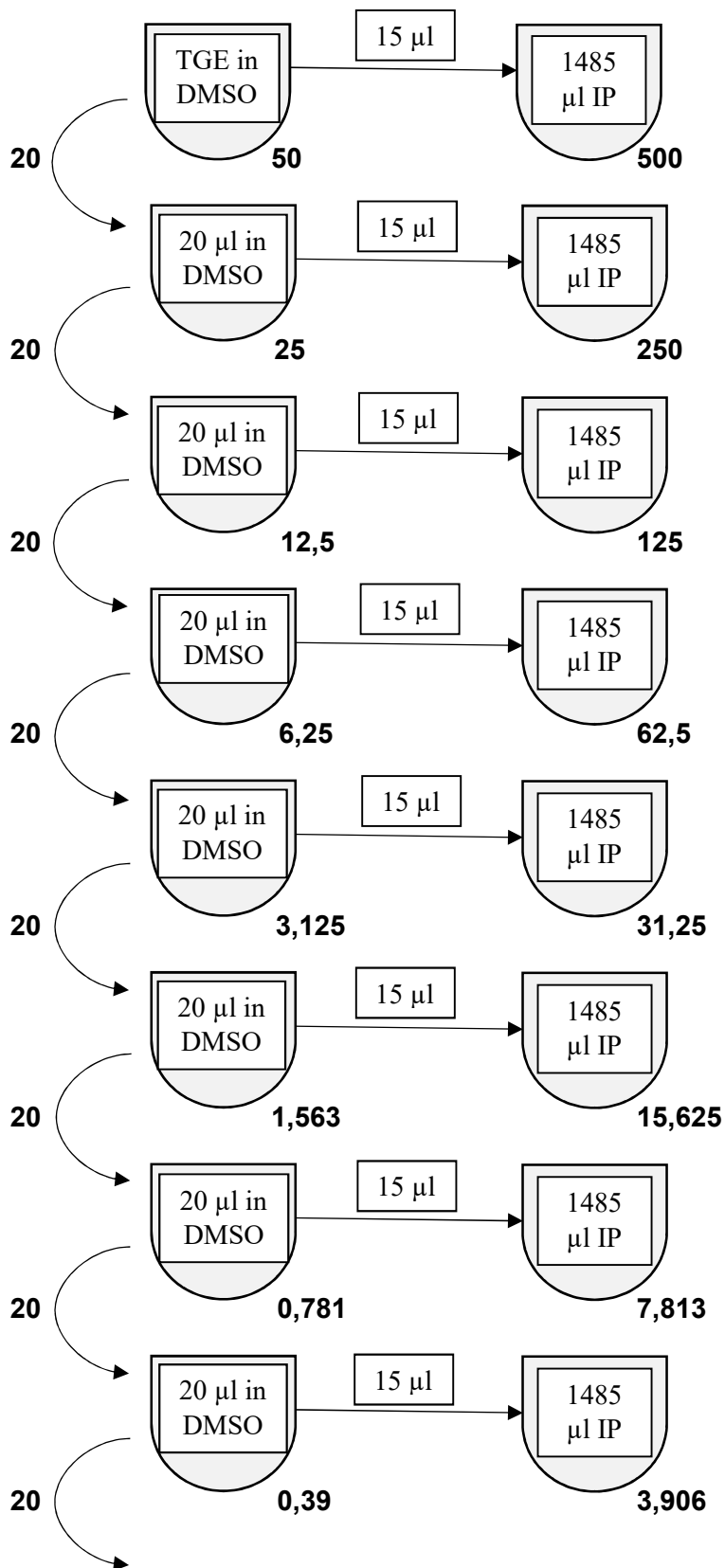


Abb. 8.1: Plattenbelegung für die Transportversuche zur Überprüfung der Funktionalität der Transportproteine.

8.5.3 Kompetitionsassays der Aufnahmetransporter

IP: 18,5 ml IP + 18,5 μ l BSP (1 mmol/l) + 2,59 μ l [3 H] BSP

Menge [μ l] Konzentration TGE [mmol/l] Konzentration TGE [μ mol/l]



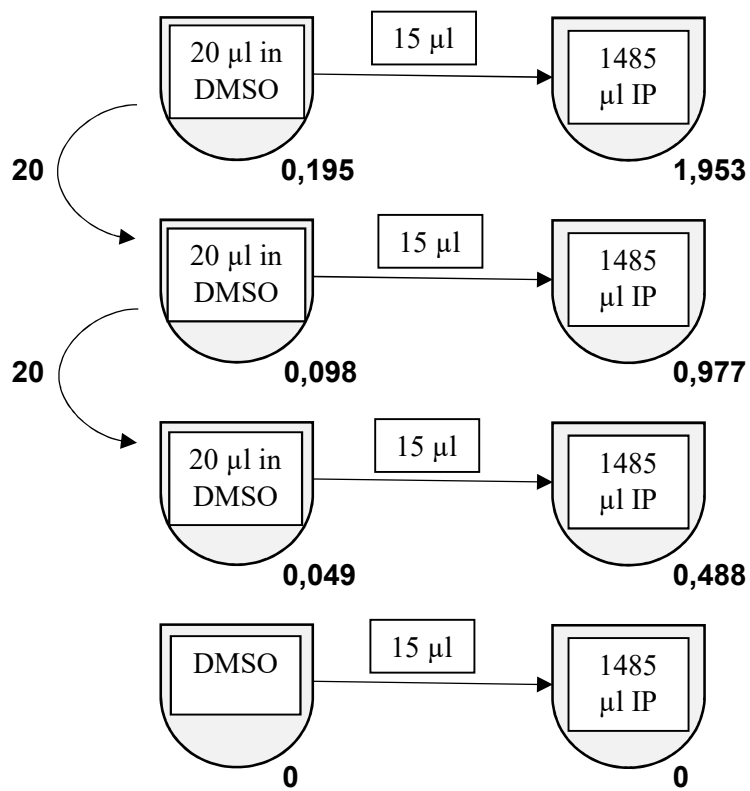


Abb. 8.2: Ansatz der Verdünnungsreihe für den Kompetitionsassay an HEK-OATP1B3 und -2B1 Zellen.

Konzentration TGE

0 $\mu\text{mol/l}$	3,906 $\mu\text{mol/l}$
0,488 $\mu\text{mol/l}$	7,813 $\mu\text{mol/l}$
0,977 $\mu\text{mol/l}$	15,625 $\mu\text{mol/l}$
1,953 $\mu\text{mol/l}$	31,25 $\mu\text{mol/l}$

Diese Plattenbelegung erfolgte je einmal für die folgenden Zelllinien:
HEK-pQCXIN
HEK-OATP1B3
HEK-OATP2B1

62,5 $\mu\text{mol/l}$			
125 $\mu\text{mol/l}$			
250 $\mu\text{mol/l}$			
500 $\mu\text{mol/l}$			

Abb. 8.3: Plattenbelegung mit verschiedenen Konzentrationen von Tigecyclin beim Kompetitionsassay an HEK-OATP1B3 und -2B1 Zellen.

IP für HEK-OATP1B1: 2 ml IP + 2 μl BSP (1 mmol/l) + 0,28 μl [^3H] BSP

IP für HEK-NTCP: 2 ml IP + 2 μl TA (10 mmol/l) + 0,5 μl [^3H] TA

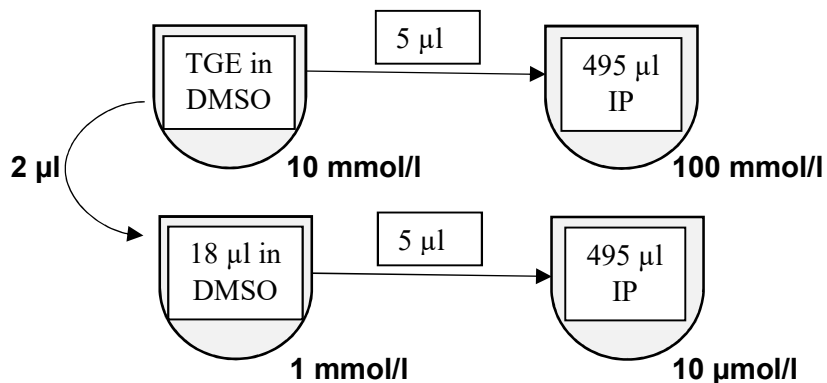


Abb. 8.4: Ansatz der Verdünnungsreihe für den Kompetitionsassay an HEK-OATP1B1 und -NTCP Zellen.

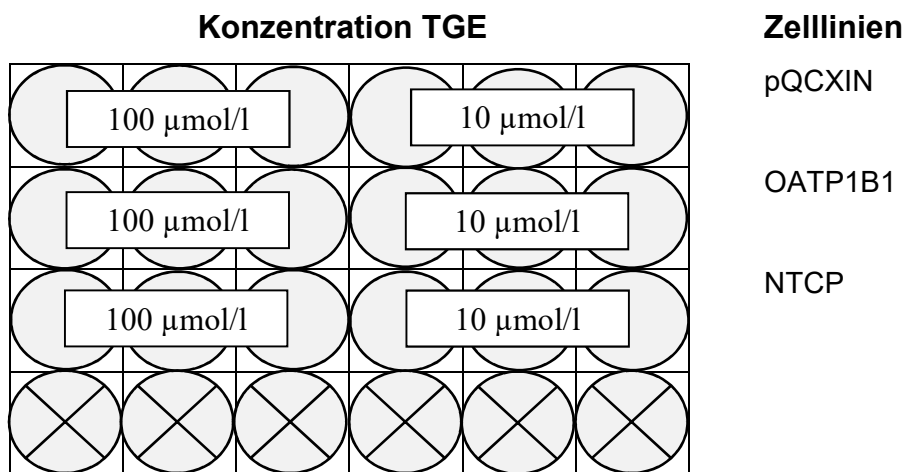


Abb. 8.5: Plattenbelegung mit verschiedenen Konzentrationen von Tigecyclin beim Kompetitionsassay an HEK-OATP1B1 und –NTCP Zellen.

8.5.4 Zeit- und konzentrationsabhängige Aufnahmeassays

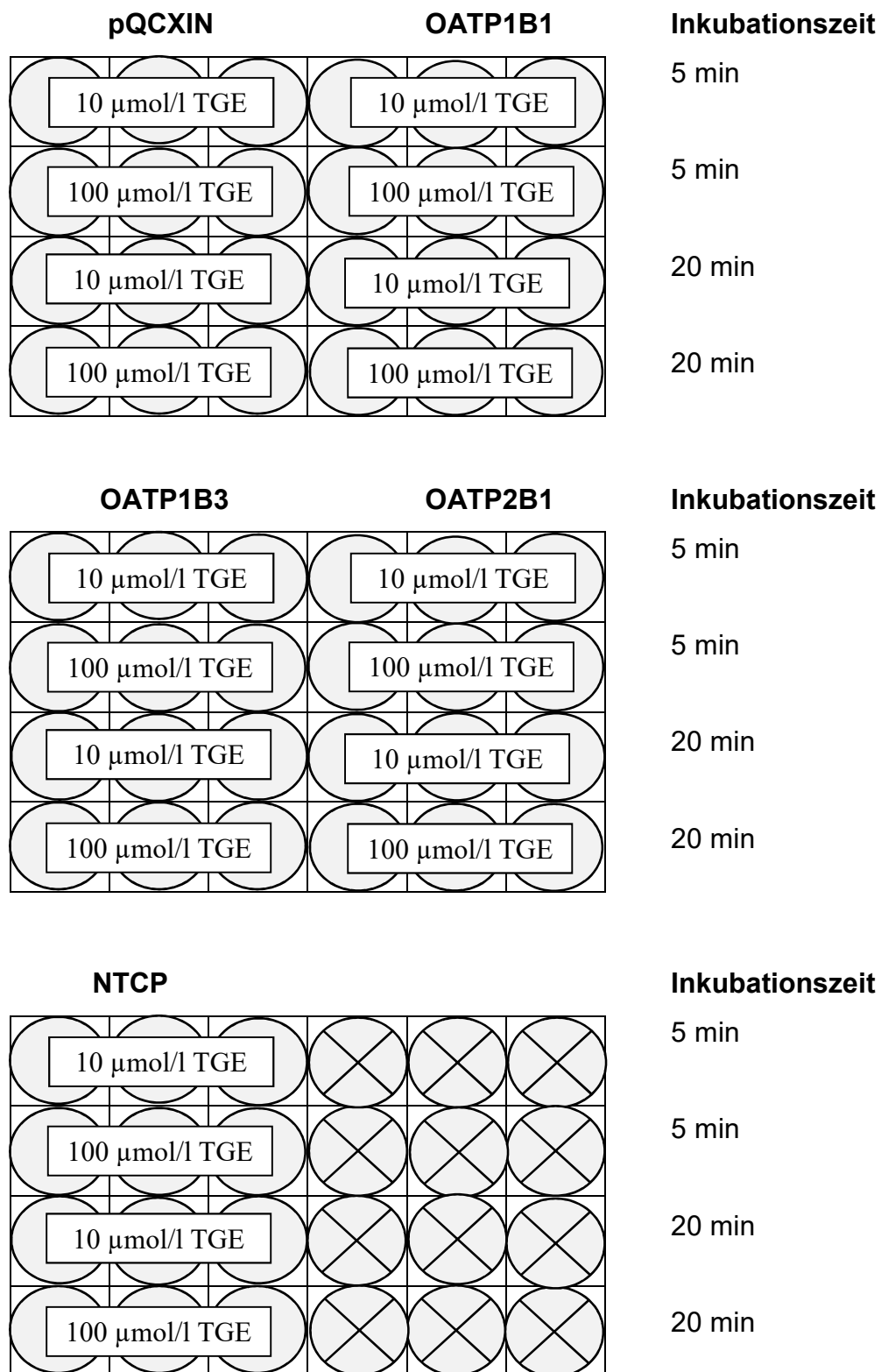


Abb. 8.6: Plattenbelegung des zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahmeassays mit 10 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 100 $\mu\text{mol/l}$ Tigecyclin und einer 5- bzw. 20-minütigen Inkubation.

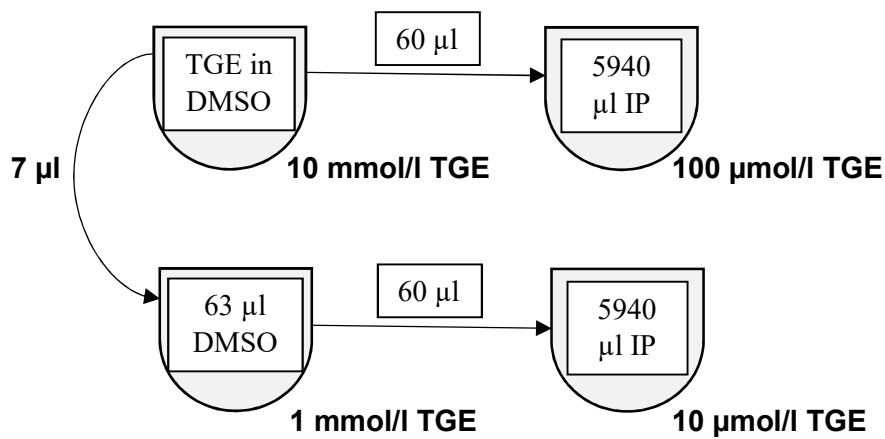


Abb. 8.7: Ansätze der Versuchslösungen für die zeit- und konzentrationsabhängigen Aufnahmeassays mit Tigecyclin.

8.5.5 Vesikelassays der Effluxtransporter

je mit MRP2- und MRP3-Vesikeln

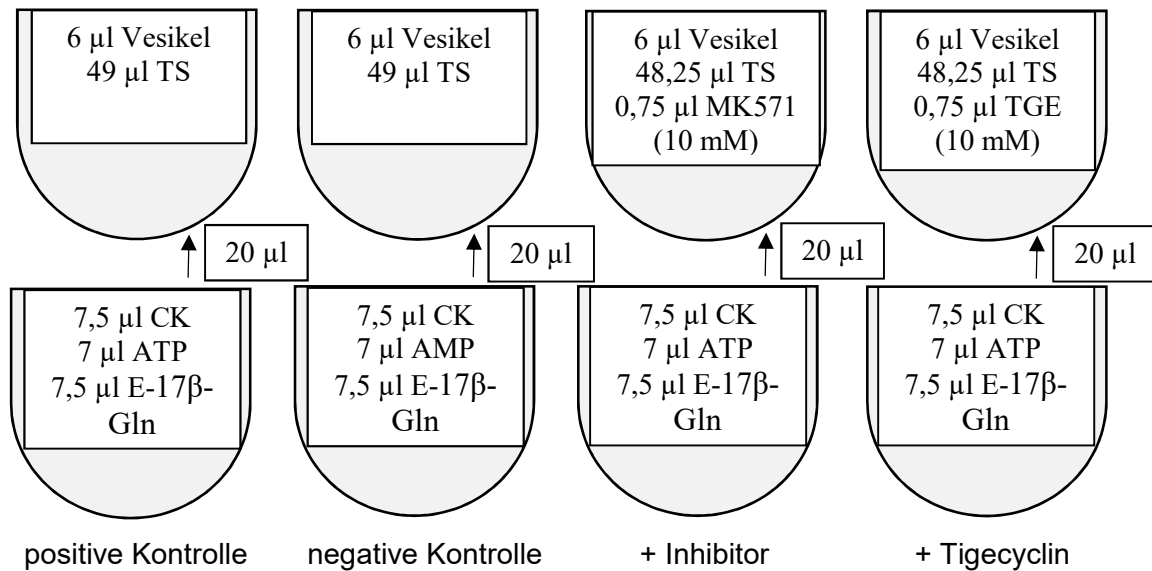


Abb. 8.8: Versuchslösungen des Kompetitionsassays mit TGE in MRP2- und MRP3-Vesikeln.

je mit MRP2- und MRP3-Vesikeln

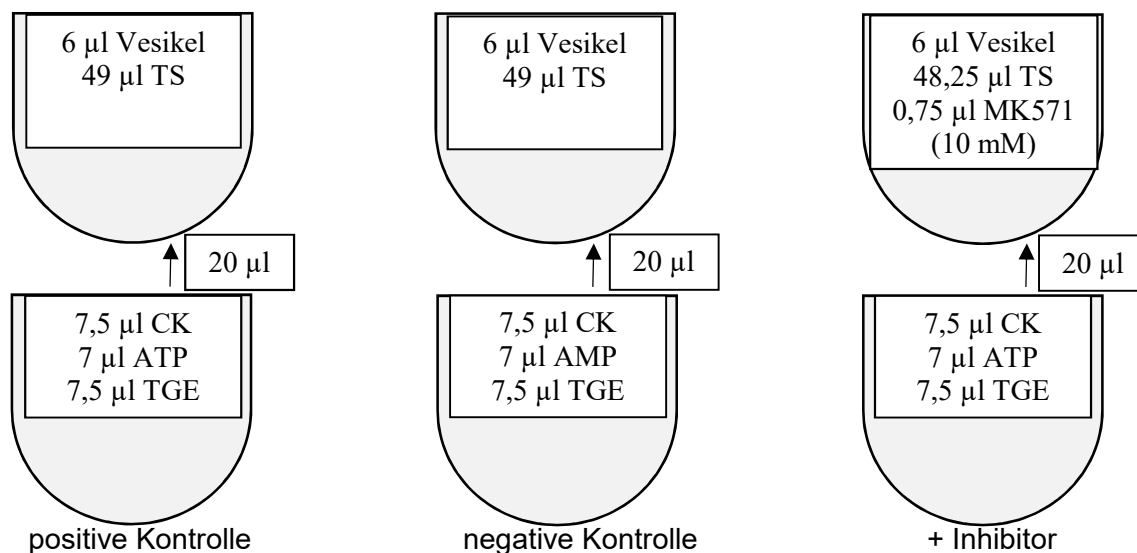


Abb. 8.9: Versuchslösungen des Aufnahmeassays mit TGE in MRP2- und MRP3-Vesikeln.

8.6 Ergebnisse

8.6.1 Zellviabilität

Tab. 8.4: Mit *PrestoBlue*[®] untersuchte Zellviabilität bei Zugaben von 0 µmol/l, 10 µmol/l und 100 µmol/l Tigecyclin und einer Inkubationszeit von 0, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min (n = 2 im Triplikat).

Zelllinien	Inkubationszeit [min]	Konzentration Tigecyclin [µmol/l]	Zellviabilität Mittelwert [%]	Zellviabilität Standardabweichung [%]
pQCXIN	0	0	100	0
		10	96	4
		100	101	0
	10	0	100	0
		10	96	3
		100	97	3
	20	0	100	0
		10	97	4
		100	98	2
	30	0	100	0
		10	96	4
		100	97	4
	60	0	100	0
		10	94	9
		100	95	7
	90	0	100	0
		10	93	11
		100	92	5

	120	0 10 100	100 93 93	0 12 11
OATP1B1	0	0 10 100	100 103 104	0 4 0
	10	0 10 100	100 105 104	0 1 3
	20	0 10 100	100 106 105	0 6 8
	30	0 10 100	100 104 104	0 3 7
	60	0 10 100	100 106 105	0 3 12
	90	0 10 100	100 108 106	0 8 20
	120	0 10 100	100 109 105	0 8 17
OATP1B3	0	0 10 100	100 99 104	0 1 0
	10	0 10 100	100 105 107	0 4 4
	20	0 10 100	100 106 107	0 3 7
	30	0 10 100	100 103 104	0 2 6
	60	0 10 100	100 110 111	0 6 12
	90	0 10 100	100 111 112	0 2 12
	120	0 10 100	100 110 111	0 1 13
OATP2B1	0	0 10 100	100 101 105	0 0 1
	10	0 10 100	100 100 103	0 1 1
	20	0 10 100	100 104 106	0 4 5
	30	0 10	100 101	0 1

		100	102	2
	60	0	100	0
		10	105	4
		100	105	6
	90	0	100	0
		10	102	7
		100	104	11
	120	0	100	0
		10	105	6
		100	104	9
NTCP	0	0	100	0
		10	99	2
		100	99	4
	10	0	100	0
		10	103	11
		100	100	3
	20	0	100	0
		10	105	13
		100	103	5
	30	0	100	0
		10	99	7
		100	103	9
	60	0	100	0
		10	101	8
		100	99	0
	90	0	100	0
		10	98	8
		100	98	4
	120	0	100	0
		10	95	9
		100	98	3

8.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

8.8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Siegmund bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotionsarbeit in seinem Arbeitskreis in der Abteilung für Klinische Pharmakologie am Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald anzufertigen.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald und Herrn Dr. med. vet. Markus Keiser für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die gute Betreuung während meiner praktischen Arbeit, für die Gabe vieler Anregungen und Hilfestellungen sowie für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich selbstverständlich auch beim Zweitgutachter meiner Promotionsarbeit bedanken.

Danken möchte ich neben Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Oswald auch Herrn Dr. Eberhard Scheuch, Frau Anja Moll, Frau Gitta Schumacher und Frau Sabine Bade für die tatkräftige Unterstützung bei den analytischen Messungen mittels LC-MS/MS Messmethode.

Vielen herzlichen Dank an alle, die mich bei den unzähligen Versuchen unterstützt haben: Beatrice Kisser, Jenny Hagemann, Sarah Berlin und natürlich Markus Keiser.

Bei Danilo Wegner bedanke ich mich für die Unterstützung bei diversen mathematischen oder computertechnischen Fragen.

Vielen Dank an alle Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre!

Danke an Pascal Erdmann und Oke Stückrad für Eure immer aufmunternden Worte und die Freundschaft, die sich während unserer Zeit als Doktoranden entwickelt hat.

Außerdem möchte ich allen meinen Freunden für den sozialen Halt und die vielen kostbaren gemeinsamen Stunden danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken für die Unterstützung während meines gesamten Studiums. Vielen Dank, dass Ihr mir stets zur Seite steht.